

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1935-1936

N° 26

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA MÉTHODE DE KJELDAHL
EMPLOI DE L'ACIDE PERCHLORIQUE**

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

**Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)**

présentée et soutenue le : juillet 1936

par

Henriette GAUDUCHON-TRUCHOT

Pharmacien

JURY { MM. R. FABRE, *Président.*
A. GORIS, *Professeur.*
P. FLEURY, *Agrégé.*

IMPRIMERIE HENRY
30, rue Pascal,
PARIS

1936

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA MÉTHODE DE KJELDAHL
EMPLOI DE L'ACIDE PERCHLORIQUE**

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUERIN, Doyen, O. *, ☼ I.
 P. LEBEAU, Assesseur, O. *, ☼ I.
 P. DESPORT, Secrétaire, *, ☼ I.

PROFESSEURS

MM. GUERIN, O. *, ☼ I.	Botanique générale.
PERROT, C. *, ☼ I.	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIERE, O. *, ☼ I.	Zoologie.
LEBEAU, O. *, ☼ I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, O. *, ☼ I.	Chimie analytique.
GORIS, O. *, ☼ I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. *, ☼ I.	Physique.
DAMIENS, *, ☼ I.	Chimie minérale.
HERISSEY, O. *, ☼ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, *, ☼ I.	Chimie organique.
LUTZ, *, ☼ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, *, ☼ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. *, ☼ I.	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, ☼ I.

Professeurs honoraires : MM. BEHAL, G. O. *, ☼ I.,
 DELEPINE, O. *, ☼ I.,
 Membres de l'Institut;
 M. GUERBET, *, ☼ I.

CHARGES DE COURS

MM. Marc HONNORAT, *, ☼ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. *, ☼ I.	Pharmacodynamie.
DELABY, *, ☼ I.	Hydrologie et Hygiène.
PICON, ☼ I.	Chimie minérale et Minéralogie.
BACH, ☼ I.	Microbiologie.

AGREGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, ☼ I.	MM. MASCRE, ☼ I.	MM. BEDEL, ☼ I.
PICON, ☼ I.	FLEURY, ☼ I.	REGNIER, ☼ I.
	BACH, ☼ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☼ I., agrégé, chargé des T.P. de 1 ^{re} année ...	Chimie générale.
FLEURY, ☼ I., et REGNIER, ☼ I., agrégés, chargés des travaux de ...	Chimie analytique.
SOUEGÈS, ☼ I.	Micrographie.
LEROUX, ☼ I.	Physique.
DEVAL, *, ☼ I.	Microbiologie.
DELABY, *, ☼ I., PICON, ☼ I., et MASCRE, ☼ I. : agrégés, chargés des travaux généraux de 4 ^e année.	

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ☼ I.



A LA MEMOIRE DE MES SOEURS

A LA MEMOIRE D'YVES GAUDUCHON

A MES PARENTS

A MON MARI

A MON FILS

A MES BEAUX-PARENTS

A Monsieur le PROFESSEUR RENÉ FABRE
Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie et
à l'Institut d'Hygiène Industrielle et de Médecine
du Travail
de la Faculté de Médecine de Paris,
Pharmacien en Chef du Groupe Hospitalier
Necker-Enfants-Malades,
Conseiller sanitaire technique, chargé de la Direction des
Laboratoires de l'Académie de Médecine et du
Ministère de la Santé Publique,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

*Témoignage de profonde reconnaissance
et de respectueux dévouement.*

A Monsieur le PROFESSEUR ALBERT GORIS
Professeur de Pharmacie Galénique à la Faculté de
Pharmacie de Paris,
Directeur de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux de Paris,
Membre de l'Académie de Médecine,
Officier de la Légion d'Honneur.

Hommage de profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Agrégé Paul FLEURY

Hommage respectueux.

MEIS ET AMICIS

INTRODUCTION

Le problème du dosage de l'azote dans les substances organiques a été, sans conteste, et est encore, une des questions les plus étudiées de la chimie analytique. Il est, en effet, d'une très grande importance et, en même temps, présente des difficultés sans nombre étant données la complexité et la variété des substances auxquelles on a affaire. Qu'il s'agisse de doser l'azote dans des produits chimiques définis ou dans des substances biologiques, ou, encore, dans des produits techniques, tels que charbons, caoutchouc, farines, engrais, etc., le comportement des molécules azotées n'est pas invariablement le même, c'est ce qui explique la diversité des méthodes employées qui, donnant de bons résultats dans quelques cas, ne peuvent plus être appliquées dans d'autres.

Cela légitime, à notre avis, la place importante que nous avons donnée à l'étude bibliographique, qui constitue la première partie de notre travail. Cependant, nous n'avons pas relevé toutes les modifications qu'a subies la méthode de KJELDAHL, depuis qu'elle a vu le jour, car, les excellents exposés de MESTREZAT et Mlle JANET, en 1921, puis de LEVALTIER, en 1924, dans lesquels sont passées en revue toutes les techniques dérivant du mode opératoire décrit par KJELDAHL, en 1885, avaient fait le point sur cette question.

A de rares exceptions près, nous n'avons signalé que les travaux publiés sur ce sujet depuis 1924. Les applications multiples de la méthode de KJELDAHL, nous ont obligée à

rechercher des références, non seulement dans les publications scientifiques courantes, françaises et étrangères, mais encore dans des revues techniques de caractère strictement industriel.

Parmi les adjuvants fréquemment employés depuis une dizaine d'années, figure l'acide perchlorique, dont on a utilisé ainsi la puissante activité vis-à-vis des substances organiques. Or, au sujet de son emploi possible pour la détermination de l'azote, les auteurs, ainsi que nous le verrons plus loin, n'ont pas toujours été d'accord.

Il entraînait dans le programme des recherches du laboratoire de Toxicologie de la Faculté de Pharmacie de Paris, d'étudier l'application de l'acide perchlorique au dosage de l'azote. Cette tâche nous fut confiée par M. le Professeur René FABRE. Nous avons donc recherché les conditions d'emploi de l'acide perchlorique avec le maximum d'avantages du point de vue de la destruction et le minimum d'inconvénients du point de vue rendement en azote.

C'est pourquoi, dans la deuxième partie de notre travail, nous avons réuni les essais que nous avons effectués sur des corps de constitution variée : caséine, uréthane, acide hippurique, afin d'établir une technique de destruction rapide et précise.

Après avoir établi une technique de destruction sulfo-perchlorique, nous avons, ainsi que nous l'exposerons dans la troisième partie, essayé de l'appliquer à diverses substances chimiques et biologiques.

Afin de pouvoir juger de la valeur de cette technique, nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux donnés par les méthodes par voie sèche, de DUMAS modifiée par WAHL et SISLEY, de TER MEULEN, et par la technique par voie humide de LAURO au sélénium et celle de PÉNAU et GAUDUCHON, à l'acide sélénieux.

Enfin, en raison de la rapidité et de la facilité de l'emploi de ce mode de destruction sulfo-perchlorique, nous avons pensé qu'il serait possible de l'employer, en chimie analytique qualitative, pour la recherche de l'azote dans les composés organiques. Le troisième chapitre de la troi-

sième partie a été consacré à l'établissement et à l'application d'une technique.

Voici, pour nous résumer, le plan de notre travail :

INTRODUCTION.

PREMIÈRE PARTIE. — Etude bibliographique des modifications apportées à la méthode de KJELDAHL, depuis 1924.

DEUXIÈME PARTIE. — Conditions d'emploi de l'acide perchlorique pour la destruction des matières organiques, en vue du dosage de l'azote. Etablissement d'une technique.

TROISIÈME PARTIE. — Application de cette technique à des corps chimiquement définis, à des substances biologiques, à la recherche qualitative de l'azote.

CONCLUSIONS.

Qu'il nous soit permis, avant d'entrer dans le vif du sujet, d'exprimer, ici, à notre Maître, M. le Professeur René FABRE, toute notre reconnaissance pour l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé, dans son laboratoire, et pour les conseils éclairés qu'il a bien voulu nous donner.

A M. le Professeur Albert GORIS et à M. le Professeur agrégé Paul FLEURY qui ont bien voulu nous faire l'honneur de faire partie de notre jury de thèse, nous adressons l'expression de nos bien vifs remerciements. M. Paul CUFÉRAMY, Pharmacien des Hôpitaux et Assistant de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Paris, a mis à notre disposition, avec une parfaite bonne grâce, les ressources du Laboratoire, nous lui exprimons notre vive reconnaissance.

Nous remercions, également, M. Ernest KAHANE, Docteur ès-Sciences, pour l'aide efficace qu'il nous a apportée dans la conduite de ce travail et pour la cordialité avec laquelle il a bien voulu nous faire profiter de sa précieuse expérience.

Une partie de nos essais a été effectuée dans les laboratoires de recherches des Etablissements BYLA ; nous sommes heureux d'adresser à M. Henry PÉNAU, Docteur ès-Sciences, Directeur des Etablissements BYLA, nos sentiments de très sincère reconnaissance. Les dosages que nous avons pratiqués par la méthode de TER MEULEN ont été poursuivis au laboratoire de M. le Professeur R. MARQUIS, à l'Institut de Chimie de Paris ; nous remercions vivement M. André BARBOT, Assistant à l'Institut de Chimie de Paris, d'avoir aimablement mis à notre disposition le matériel nécessaire à nos analyses. Nous avons, également, effectué une série d'expériences dans le laboratoire de M. le Professeur WAHL, au Conservatoire des Arts et Métiers, où M. Henri WAHL et M. Marc RINGEISSEN nous ont, avec la plus grande cordialité, initiée à la technique de DUMAS modifiée ; qu'ils trouvent ici, l'expression de nos vifs remerciements.

Enfin, nous assurons de notre bon souvenir nos camarades de laboratoire, avec qui nous avons entretenu les relations les plus cordiales.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES MODIFICATIONS APPORTEES A LA METHODE DE KJELDAHL DEPUIS 1924

Remarques préliminaires

MESTREZAT et Mlle JANET [85], passant en revue les techniques dérivées de la méthode primitive de KJELDAHL, avaient classé les adjuvants employés en cinq catégories :

1° Les élévateurs de température.

2° Les oxydants.

3° Les catalyseurs.

4° Les oxydo-catalyseurs

5° Les réducto-catalyseurs.

Cette classification fut conservée par LEVALTIER [70] qui ajouta une sixième catégorie d'adjuvants : les réducteurs.

Nous ne voudrions pas oublier de mentionner ici que nous avons trouvé de précieuses indications bibliographiques, dans les exposés de BOVIN [8] et dans ceux de SISLEY et DAVID [111], publiés en 1929.

Nous avons gardé la classification de LEVALTIER, afin que notre étude bibliographique ne fasse ainsi que prolonger la sienne jusqu'à 1935. Pour cette raison, nous avons adopté, pour la première partie de ce travail, la division suivante :

CHAPITRE I. — Les élévateurs de température.

CHAPITRE II. — Les réducteurs.

CHAPITRE III. — Les catalyseurs.

CHAPITRE IV. — Les réducto-catalyseurs.

CHAPITRE V. — Les oxydo-catalyseurs.

CHAPITRE VI. — Les oxydants.

CHAPITRE PREMIER

Elévateurs de température

Après avoir rappelé que MARGOSCHES et VOGEL [78], en utilisant le sulfate de potassium, préconisé, en 1889, par GUNNING [44], ont pu, en 1919, doser l'azote de manière satisfaisante dans les dérivés ortho des mononitrophénols, des acides mononitrobenzoïques, aldéhydes mononitrobenzoïques, et montrer, en 1922, que le sulfate de potassium était plus efficace que le sulfate de sodium et le sulfate de lithium, nous signalerons le mélange :

SO^4H^2 pur, d. 1,83	5 cm ³
PO^4H^3 , d. 1,75	15 cm ³
SO^4K^2	5 g.

employé par FLEURY et LEVALTIER [33] après des essais comparatifs sur la caséine au moyen de catalyseurs et de réducteurs. Ces auteurs ont obtenu d'excellents résultats, notamment avec les corps suivants, réputés comme particulièrement résistants : créatine, scatol, isatine, quinine, hydrate de pipérazine, morphine, brucine, strychnine, choline, bêtaïne, atropine, tyrosine.

Grâce à cette technique, après un chauffage de 1 h. 30, tout l'azote de la pyridine a été transformé en ammoniacque, ce que seuls, avant FLEURY et LEVALTIER, VILLIERS et MOREAU-TALON [125] avaient réalisé.

Par contre, ce procédé n'a pas permis d'obtenir des résultats exacts avec les groupements pour lesquels les auteurs s'accordaient à reconnaître la nécessité d'une réduction et

pour lesquels, à cet effet, FLEURY et LEVALTIER ont conseillé, ainsi que nous le dirons par la suite, l'emploi de l'acide benzoïque ou du zinc, en présence d'alcool et d'eau, ou de ces deux réducteurs utilisés simultanément.

En 1925, MARGOSCHES et SCHEINOST [76], en se servant de proportions diverses de sulfate de sodium, de potassium ou de lithium, n'ont pu obtenir de résultats satisfaisants avec l'orthonitraniline, alors qu'il est possible de doser directement l'azote de la métanitraniline, ainsi que l'avaient vu MARGOSCHES et ses collaborateurs.

En 1927, GUILLAUME [42], reprenant la méthode de FLEURY et LEVALTIER, a remplacé l'acide phosphorique à 60° B (d. 1,75) renfermant 90 p. 100 de PO^4H^3 , par l'acide phosphorique du Codex, contenant 50 p. 100 de PO^4H^3 . Cette substitution a l'avantage de donner aux matras de KJELDAHL une plus grande résistance. La méthode a pu être étendue au dosage de l'azote dans des alcaloïdes renfermant des groupements pipéridiniques (spartéine, cicutine) et aussi dans la nicotine, la pilocarpine, la pseudo-pelletiérine.

En 1929, BOIVIN [8] a fait remarquer que, pour la micro-analyse de l'azote, « il fallait éviter soigneusement d'utiliser trop de sulfate de potassium, sous peine de courir au devant de dosages complètement faussés par suite d'un départ d'azote gazeux.

Ce qui vient corroborer les observations faites, en macro-analyse, par SELF [106], dès 1912, puis par CARPIAUX [12] en 1913, et LEBEDIANTZEW [66] en 1915. Nous reviendrons sur ces importantes indications de BOIVIN, à propos des oxydo-catalyseurs.

En 1934, TCHEPELEVETZKII et FAIN [119] ont conseillé, pour la détermination de l'azote dans la cyanamide calcique, l'emploi de l'acide sulfurique et du sulfate de potassium : pour 5 g. de substance, 15 g. de sulfate de potassium et 50 cm³ d'acide sulfurique concentré. La même année, LEMOIGNE, DÉSVAUX et MONGUILLON [68] ont insisté sur l'influence de la concentration en sulfate de potassium du

liquide de destruction : la présence de trop fortes proportions de sulfate de potassium pouvant, dans le cas de la caséine, occasionner des pertes d'azote, lors de l'emploi de la méthode de GUNNING.

Les élévateurs de température ont été, de plus, utilisés en association avec :

1° Des réducteurs (MARGOSCHES, SCHEINOST et WOYNAR [77], ELEK et SOBOTKA [28]).

2° Des catalyseurs (BAL [4], ANDERSEN et JENSEN [2] ; SZAYSKY [103] ; RAMASVANI SIVAN et SANYASI RAJU [112] ; SISIŁEY et DAVID [111] ; LEPPER [69] ; MESSMAN [81] ; MIETHKE et FINZENHAGEN [86]).

3° Des réducto-catalyseurs (SJOLLEMA et SEEKLES [113] ; LAURO [65], DONOVAN [24]).

4° Des oxydo-catalyseurs (MARGOSCHES et VOGEL [78] ; POTH, ARMSTRONG, COGBURN et BAILEY [95] ; BOIVIN [8] ; URBACH [124] ; PÉNAU et GAUDUCHON [93] ; HITCHCOCK et BELDEN [46] ; LEMOIGNE, DÉSVEAUX et MONGUILLON [68] ; GUILLEMET et SCHELL [43]).

5° Des oxydants (DUPRAY [26] ; BERMAN et LAUFER [7] ; CHRISTENSEN et FULMER [15] ; LUNDIN et ELLBURG [72]).

Nous reviendrons là-dessus dans les chapitres suivants.

Ainsi donc, l'emploi d'élévateurs de température, dans des conditions bien déterminées, sur lesquelles nous avons insisté, a permis le dosage de l'azote, par la méthode de KJELDAHL, dans des corps particulièrement résistants, comme la pyridine, et ce, dans des temps relativement courts. Il n'a cependant permis d'obtenir des résultats corrects sur les substances chimiques pour lesquelles, de l'avis général, une réduction est indispensable (nitrates, nitriles, oximes, pyrazol, dérivés nitrés, etc.).

CHAPITRE II

Réducteurs

Après avoir signalé qu'en 1922, M. et I. SBOROWSKY [104] ont montré que I^2Hg^2 constituait un accélérateur puissant de la destruction de la matière organique par SO^4H^+ et qu'il pouvait remplacer le mercure métallique, ayant sur ce dernier l'avantage d'agir beaucoup plus énergiquement, nous rappellerons qu'en 1924, FLEURY et LEVALTIER [33], en utilisant l'acide benzoïque avec SO^4H^2 , SO^4K^2 , PO^4H^3 , ont pu doser correctement l'azote dans les corps suivants : nitrate de potassium, benzonitrile, acétoxime, benzophénone, oxime, azobenzol, pipéridine. De même, l'emploi du zinc, en présence d'alcool et d'eau, a conduit à de bons résultats pour l'acide picrique, le dimétanitrobenzène, la phénylhydrazine, la mannosehydrazone, la glucosazone. Enfin, l'utilisation de ces deux réducteurs a permis à LEVALTIER de doser l'azote de la semicarbazide et de ses dérivés.

D'autre part, le phénol, qui avait été déjà employé par JOLDBAUER [53], en 1886, et FOERSTER [34], en 1889, a servi, en 1925, à MARGOSCHES, SCHEINOST et WOYNAR [77] pour doser l'azote des nitrates : pour 0 g., 2 de substance, ces auteurs ont préconisé l'emploi de 1 g. de phénol, 20 cm³ d'acide sulfurique et, après une heure de chauffage, 10 g. de sul-

late de potassium. Cette technique est applicable au dosage de l'azote dans les ortho et paranitrophénols. MARGOSCHES et SCHEINOST [75] ont, de plus, signalé que, pour la kjeldahlisation des nitrates, le phénol était remplaçable par la résorcine, la phloroglucine. L'hydroquinone, la pyrocatechine, l'oxyhydroquinone, le pyrogallol, occasionneraient une perte d'azote. Les acides salicylique et m-oxybenzoïques ne conviennent pas non plus. En 1925, DEB [20] a pu employer, pour la réduction préalable des nitrates, l'hyposulfite de sodium et l'acide thiosalicylique.

En 1926, ELEK et SOBOTKA [28], pour la détermination par micro-Kjeldahl de composés nitrés divers (Chlorure de nitrobenzoyle, β -nitrosonaphtol, nitropropanol, acide picrique, nitrouracile, m-nitraniline) ont mis en œuvre, pour 0 g., 003 à 0 g., 010 de substance :

glucose	0 g., 05 à 0 g., 10
SO ⁴ K ²	1 g.
SO ⁴ Cu	un petit cristal
SO ⁴ H ²	3 cm ³

La même année, EDWARDS [27], avec la technique au phénol de JOLDBAUER, a obtenu des résultats corrects avec le nitrate d'ammonium, le nitrate de potassium, le nitrobenzène, le nitronaphtalène, la nitroaniline, l'acide picrique, le dinitrobenzène. En 1926 également, BOUYER [10], pour 1 g. de farine, se servit de 15 cm³ d'acide sulfurique pur, 3 g. d'oxalate de potassium, 10 cm³ de solution d'eau oxygénée à 3 p. 100.

En 1928, OLSEN [90], pour le dosage de l'azote dans les sols, afin de doser l'azote existant sous forme de nitrite et de nitrate, a conseillé une réduction préalable au moyen, pour 5 g. de sol, de 5 g. de ferrum reductum et de 30 cm³ d'acide sulfurique dilué (1 partie d'acide sulfurique pour deux parties d'eau en volumes).

En 1929, LUCAS et HIRSCHBERGER [71], pour doser l'azote dans un mélange de nitrate et d'urée, ont préconisé une réduction préalable par le fer en poudre et l'acide sulfurique. La même année, SISLEY et DAVID [111] ont étudié l'in-

fluence d'adjuvants divers sur le dosage de l'azote de l'acide picrique par la méthode de KJELDAHL. Ils ont été amenés à classer les substances utilisées en :

1° Substances sans action : benzène, toluène, acides oxalique, acétique, benzoïque, formique, anhydride phthalique.

2° Substances donnant une diminution de la perte en azote : naphthalène, alcool, acide salicylique, sulfochlorure de toluène, glycérine, formol, acides citrique, tartrique, gallique, terpène, huile d'olive, phénol, furfurol, acétone.

3° Substances donnant un dosage correct : glucose, sucre, quinone, quinone sulfonique, hydroquinone, résorcine, pyrocatéchine, pyrogallol, anthracène, acide lactique, β -naphthol.

Ces auteurs ont, de plus, montré que l'action favorable de certaines de ces substances est due au fait qu'elles exercent une action réductrice sur l'acide sulfurique, à basse température, engendrant ainsi de l'acide sulfureux naissant qui produirait la réduction des groupements nitrés.

Cependant, l'emploi de l'acide pyrogallique, qui est, en ce qui concerne l'acide picrique, avec la pyrocatéchine et l'hydroquinone, l'adjuvant le plus actif, ne peut pas être généralisé. Mais, SISLEY et DAVID, en effectuant une réduction préalable au moyen de l'hydrosulfite de sodium, que RANKER [96] avait déjà utilisé en milieu sulfurique en présence d'acide salicylique, ont obtenu des résultats satisfaisants avec les dérivés nitrés, nitrosés, azoxyques et azoïques.

En 1930, DORFMULLER [25] a montré qu'il était impossible de décrire un mode opératoire général s'appliquant aux osazones et aux hydrazones. C'est ainsi que la réduction préalable par l'acide chlorhydrique et le zinc en poudre permet ensuite de kjeldahliser correctement la maltosazone et la lactosazone, mais donne des valeurs trop élevées dans le cas de la glucosazone, tandis que la réduction, en milieu alcalin, par l'hydrosulfite de sodium donne des résultats satisfaisants s'il s'agit de la lactosazone ou de la maltosazone, mais pas avec la glucosazone. Il en est de même pour les hydrazones.

La même année, WEIZMANN, YOFE et KIRZON [128] se sont servis de zinc en poudre pour les déterminations de l'azote dans les dérivés nitrés aromatiques. Dans le même but, SIMEK [109], en 1931, a employé une solution saturée d'hyposulfite de sodium.

En 1933, FRIEDRICH [37] a indiqué que le dosage de l'azote dans les hydrazines et leurs dérivés, les corps nitrés, nitrosés, azoïques, est possible par la méthode de KJELDAHL, à condition de traiter ces substances par l'acide iodhydrique bouillant, en tube scellé au besoin, avant la minéralisation par l'acide sulfurique. L'antipyrine a pu être dosée par ce procédé qui n'est pas applicable aux nitrates.

En 1934, VLADescu et ZAPOROJANU [126] ont signalé que, comparativement aux autres procédés, la technique de FOERSTER permettait seule d'obtenir le pourcentage maximum d'azote dans le tabac, la nicotine et le nitrate de potassium.

Que conclure de tous ces faits ?

L'emploi des réducteurs est indispensable pour la détermination de l'azote par voie humide dans certaines molécules incomplètement détruites dans le cas de l'usage de la méthode de KJELDAHL. Or, il ne semble pas qu'il ait encore été trouvé un réducteur pouvant être utilisé dans tous les cas. Aussi, n'en reste-t-il pas moins vrai que l'emploi simultané de plusieurs réducteurs, ainsi que l'ont préconisé FLEURY et LEVALTIER, a fait faire un grand pas à la question.

CHAPITRE III

Catalyseurs

Dans son travail, LEVALTIER a soigneusement dressé la liste des catalyseurs employés comme adjuvants dans la méthode de KJELDAHL, depuis 1889, date de publication des travaux de WILFARTH [133]. Qu'a-t-il été fait depuis 1924 à ce sujet ?

En 1925, BAL [4] a préconisé, pour la détermination de l'azote dans les sols, l'emploi de $\text{SO}^4\text{H}^2 + \text{SO}^4\text{Cu} + \text{SO}^4\text{K}^2$ ajoutés au sol préalablement mouillé avec de l'eau.

En 1926, ANDERSEN et JENSEN [2], en utilisant le mélange

SO^4H^2	20 cm ³
SO^4K^2	10 g.
SO^4Cu	1 g.
SO^4Hg	0 g., 75

ont pu, en prolongeant l'ébullition de 2 à 8 heures après décoloration, suivant les substances considérées, obtenir de bons résultats, même sur la pyridine. La même année, SAZAVSKY [103], pour la détermination microanalytique de l'azote dans les mélasses, a conseillé l'emploi de SO^4Cu et de SO^4K^2 .

En 1927, RAMASVANI SIVAN et SANYASI RAJU [112], en microanalyse, se sont servis de platine associé au sulfate de potassium et à l'acide sulfurique. Rappelons que DELÉPINE [21], puis VAN DAM [18], ont montré que l'emploi de ce catalyseur occasionnait des pertes d'azote.

En 1928, IWATZURU [50], pour la micro-détermination de l'azote non protéique du sang, a remplacé le sulfate de cuivre par le tungstate de sodium.

En 1929, MACH et LEPPER [73] ont indiqué que l'on obtenait les mêmes résultats et aussi rapidement par l'emploi du sulfate de cuivre et du sulfate de potassium que par l'emploi du mercure ou du sulfate de mercure. La même année, SISLEY et DAVID [111], avec :

0 g., 5 à 1 g. de substance,
0 g., 5 SO^4Cu anhydre,
10 g. SO^4K^2 ,
20 cm^3 SO^4H^2 à 66° B,

technique déjà préconisée, en 1889, par SISLEY [110] pour le dosage de l'azote dans la fibroïne ont pu doser avec exactitude l'azote dans la tyrosine, la lysine, la créatinine, la créatine, l'histidine, la pyridine, la diphénylamine, le méthylindol, la guanidine, l'acide urique, la mélanine, la quinine, la pipérazine, substances réputées difficiles à kjeldahliser.

En 1930, LEPPER [69] a recommandé, pour le dosage de l'azote dans la cyanamide calcique, pour 5 g. d'échantillon, l'usage de 10 g. de sulfate de potassium et de 1 g. de sulfate de cuivre.

En 1932, MESSMAN [81] a préconisé l'emploi du mélange :

SO^4Na^2	90 parties
SO^4Hg	7 parties
SO^4Cu	1,5 partie
Se	1,5 partie

La même année, MIETHKE et FINZENHAGEN [86], pour le microdosage de l'azote du lait, ont employé SO^4Cu associé à SO^4K^2 .

Les catalyseurs ont été, de plus, utilisés, ainsi que nous le verrons plus loin, en association avec :

1° Des élévateurs de température et des oxydo-catalyseurs (BOIVIN [8] ; POTIL, ARMSTRONG, COGBURN et BAILEY [95], GUILLEMET et SCHELL [43]).

2° Des oxydants (ISELIN [49]).

Ainsi, donc, l'emploi des catalyseurs, seuls ou associés à d'autres adjuvants, qui diminuent notablement la durée de la destruction sulfurique des matières organiques, peut être très utile dans les applications biologiques ou industrielles de la méthode de KJELDAHL. De plus, il a permis, ces dernières années, dans des conditions expérimentales bien déterminées, d'obtenir des chiffres corrects pour des corps réputés difficilement kjeldahlisables. Mais il s'est, jusqu'à ce jour, montré inefficace pour la destruction complète de certaines substances, les dérivés du pyrazol, par exemple.

CHAPITRE IV

Réducto-Catalyseurs

En 1924, DONOVAN [24] obtint de bons résultats pour le dosage de l'azote dans les charbons avec SO^+H^2 associé à $\text{SO}^+\text{K}^2 + \text{Hg}$.

En 1925, SCHARRER [105] a employé, pour le dosage de l'azote total dans la cyanamide, la poudre de cuivre préconisée par KURSCHNER. Pour 1 g. de substance, humectée avec un peu d'eau, SCHARRER a recommandé d'ajouter 1 g. de poudre de cuivre, 30 cm³ d'acide sulfurique à 50 p. 100, puis de chauffer pendant une heure sur une toile métallique avec une petite flamme, et, la réduction terminée, la flamme ayant été relevée, de poursuivre le chauffage pendant 1/2 heure à 1 heure.

En 1926, KURSCHNER et SCHARRER [63] ont pu, avec la technique indiquée ci-dessus, obtenir des résultats satisfaisants avec la p.nitraniline, le p.nitrophénol, la pyridine, l'acide picrique, l'atropine, la brucine, le chlorhydrate de cocaïne, l'acétate de strychnine, la safranine, la p-nitrosodiméthylaniline, le p-amidoazobenzol.

En 1927, SJOLLEMA et SEEKLES [113] ont indiqué que la destruction de substances variées au moyen du mélange $\text{SO}^+\text{H}^2 + \text{P}^2\text{O}^5 + \text{Hg}$ conduisait à des chiffres d'azote plus

élevés que ceux obtenus par les techniques utilisant SO^4Cu + SO^4K^2 ou SO^4Cu + P^2O^5 ou SO^4K^2 + Hg, les dosages ayant été terminés par nesslerisation. La même année, SHEED [108] a montré que l'emploi de mercure était préférable à celui du cuivre et que le mélange Hg + Cu n'avait pas d'avantages sur le mercure seul.

En 1929, MACH et LEPPER [73] ont signalé que la destruction, lors de l'emploi du mélange SO^4Cu + SO^4K^2 , s'effectuait dans le même temps et donnait les mêmes valeurs qu'en présence de mercure ou de sulfate de mercure. Nous avons rappelé plus haut que, la même année, LUNDIN et ELLBURG [72] s'étaient servis de cuivre associé à O^2H^2 , SO^4H^2 et PO^4H^3 .

En 1931, LAURO [65] a trouvé que la destruction de la farine par la méthode de KJELDAHL, en employant le sélénium avec le sulfate de potassium et l'acide sulfurique, s'effectuait beaucoup plus rapidement qu'avec le sulfate de cuivre ou le mercure, les résultats étant, dans les deux cas, pratiquement identiques.

En 1932, BEET [5] a préconisé le sélénium pour le dosage de l'azote dans le charbon : d'après cet auteur, pour 1 g. de charbon, 0 g., 25 de sélénium catalysé mieux qu'une quantité égale d'oxyde de mercure. Dans le cas de l'emploi de 1 g. de sélénium, les résultats se trouvent inversés. La même année, SANDSTEDT [102], pour le dosage de l'azote dans la farine, est arrivé aux conclusions suivantes :

1° Le sélénium agit beaucoup plus vite que le cuivre et à peu près avec la même vitesse que l'oxyde de mercure. La digestion des échantillons est complète avec le sélénium et l'oxyde de mercure en 45 minutes, tandis qu'avec le cuivre, il faut 1 heure.

2° Il semble qu'il y ait plus de risques de perte d'azote par une très longue digestion avec le sélénium qu'avec les autres catalyseurs.

En 1932 également, CROSSLEY [17] a utilisé, pour la détermination de l'azote dans le charbon et le coke, le sélé-

nium qui permet d'obtenir un liquide clair beaucoup plus rapidement que le mercure. Puis MESSMAN [81] a, comme nous l'avons dit plus haut, employé le mélange : SO^4Na^2 , SO^4Hg , SO^4Cu , Se, qui a servi à WIENINGER [132], d'année suivante, pour le dosage de l'azote dans le malt et dans l'orge.

En 1933, TAYLOR [118], en ce qui concerne le dosage de l'azote dans les substances alimentaires, a indiqué que le mélange Se + OHg était plus actif que chacun de ces catalyseurs employés séparément. Ce fait a été également montré par OSBORN et KRASNITZ [91]. Pour une partie de substance à attaquer, TAYLOR a employé 10 parties d'un mélange de :

SO^4Na^2 , 7 OH ²	100 parties
OHg	7 parties
Se	15 parties

KURTZ [64] s'est servi de sélénium pour la détermination de l'azote des phosphoaminolipides, de même que BELOW et PAKHAMOVA [6] pour le dosage de l'azote dans les peaux. PRINCE [96] a utilisé le sélénium pour le dosage de l'azote dans les engrais. A DAVIS et WISE [19], l'emploi du sélénium comme catalyseur n'a pas paru être d'une application universelle.

En 1934, HARTLEY [45] a pu utiliser le sélénium comme catalyseur pour le dosage de l'azote dans la laine et SNIDER, et COLEMAN [114] ont combiné l'action de SeO^2 et de Cu.

La même année, GRANT [41] a préconisé l'emploi du mercure associé à SO^4KH .

L'année suivante, ILLARIONOW et SSLOJOWIEWA [48] ont étudié le mécanisme de la catalyse par le sélénium. Pour ces auteurs, le sélénium est oxydé en acide sélénique par l'acide sulfurique, l'acide sélénique servant alors de transporteur d'oxygène. De plus, ces auteurs ont indiqué que le tellure agissait comme le sélénium, mais moins fortement.

Ainsi, parmi les réducto-catalyseurs ayant servi depuis 1924, c'est le sélénium qui a été employé le plus souvent, en association avec des élévateurs de température, des catalyseurs ou des oxydo-catalyseurs. Le sélénium permet une destruction plus rapide que tous les autres adjuvants utilisés jusqu'ici. Mais il ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants avec les molécules-résistantes, ainsi que nous le signalerons dans la troisième partie de ce travail.

Cependant, son utilisation dans les analyses industrielles ou biologiques, présente, selon nous, un grand intérêt.

CHAPITRE V

Oxydo-Catalyseurs

En 1922, MARGOSCHES et VOGEL [78], avec l'oxyde de cuivre, l'oxyde de mercure, le sulfate de potassium ou le sulfate de lithium, ont dosé correctement l'azote des mononitrophénols, des acides benzoïques et cinnamiques mononitrés dans le cas où le groupement NO^2 était en position ortho par rapport aux groupes OH, COOH.

De même, MARGOSCHES, KRISTEN et SCHEINOST [74] sont arrivés à des conclusions analogues avec les nitroanisols et phénétols, nitrobenzoyl alcools, nitramines : les résultats sont bons si NO^2 est en position ortho.

En 1925, EDWARDS [27] a indiqué que la méthode de KJELDAHL-GUNNING donnait de bons résultats pour la quinine, la strychnine, l'aniline, l'atropine, la diphenylamine, la naphtylamine, la pyridine, la benzidine.

En 1926, KURSCHNER [62], en se servant d'un mélange renfermant sept parties de fer pour 1 g. d'oxyde de cuivre a pu kjeldahliser correctement le chlorhydrate de phénylhydrazine, l'antipyrine, la brucine, le dinitrobenzène.

En 1928, POTH, ARMSTRONG, COGBURN et BAILEY [95] ont pu doser l'azote dans le pétrole et le bitume, en employant l'oxyde de mercure associé au sulfate de potassium et au sulfate de cuivre.

En 1929, BOIVIN [8] a obtenu de bons résultats en dosant l'azote par micro-Kjeldahl dans la pyridine, la quinoléine,

la morphine, la quinine, l'atropine, l'indol, le tryptophane, la tyrosine, avec le mélange :

SO^4H^2	1 cm^3
SO^4K^2	1 g.
SO^4Cu	0 g. 1
OHg	0 g. 1

Mais, il ne put arriver à des chiffres acceptables pour l'azote de l'acide hippurique. BOIVIN a montré que, lorsque l'on dépasse la dose de 0 g., 5 de SO^4K^2 , certains corps azotés comme l'acide hippurique, la caséine, donnent lieu à une perte d'azote gazeux non négligeable et qui peut devenir considérable si l'on opère en présence de substances non azotées comme l'acide benzoïque. A la suite de ces observations, cet auteur a recommandé de limiter la dose de SO^4K^2 à 0 g., 1 et « de demander à l'action combinée de la catalyse cupro-mercurielle et d'un chauffage prolongé d'assurer la destruction intégrale des substances organiques azotées soumises au dosage ». Enfin, BOIVIN a indiqué que le micro-Kjeldahl à catalyse oxalique (micro-Denigès) et le micro-Kjeldahl à catalyse cupri-mercurique donnaient des résultats en bon accord avec ceux fournis par le micro-Dumas, en ce qui concerne le dosage de l'azote total de l'urine, ce qui n'est pas toujours le cas à l'échelle macro-analytique, ainsi que nous le verrons plus loin, de même que pour le microdosage de l'azote non protéique du sang.

En outre, d'après BOIVIN et ROCHE [9] l'utilisation du micro-Kjeldahl avec catalyse cupro-mercurielle, dans le cas particulier de l'analyse des fèces, conduit à des résultats identiques à ceux fournis par le micro-Dumas.

En 1932, URBACH [124], pour la détermination de l'azote total de 1 cm^3 d'urine, a employé 5 cm^3 d'acide sulfurique, 5 g. de sulfate de potassium et 0 g., 05 d'oxyde de cérium. La même année RICH [99] a utilisé comme catalyseur l'oxy-chlorure de sélénium associé au cuivre, ce qui réduit de moitié le temps de la destruction, comparativement à l'emploi du cuivre seul. En 1932, également, WEST et BRANNOX [129] ont aussi préconisé l'emploi d'oxychlorure de sélénium.

En 1933, HITCHCOCK et BELDEN [46] ont, de même, fait usage d'oxychlorure de sélénium associé à l'oxyde de mercure et au sulfate de potassium. Puis, TAYLOR [118] a montré que le mélange $\text{Se} + \text{OHg}$ était plus actif, pour la transformation de l'azote organique en azote ammoniacal, que chacun des catalyseurs employés séparément. Ce fait a été également démontré par OSBORN et KRASNITZ [91]. La même année PÉNAU et GAUDUCHON [93] ont pu substituer l'acide sélénieux au sélénium pour le dosage de l'azote dans les matières alimentaires et dans l'urine.

En 1934, LEMOIGNE, DÉSVEAUX et MONGUILLON [68] ont essayé, pour la caséine, en macroanalyse, la technique microanalytique de BOIVIN en employant :

SO^1Cu	2 g.
SO^4K^2	2 g.
OHg	2 g.
SO^4H^2	20 cm ³

Les résultats ont été nettement déficitaires.

GUILLEMET et SCHELL [43] ont indiqué, la même année, que le mélange :

SO^4Cu	1 partie
SO^4K^2	10 parties
Oxyde rouge de Mercure .	1 partie

associé à $\text{SO}^1\text{H}^2 + \text{PO}^1\text{H}^3$, permettait d'obtenir des résultats semblables à ceux du micro-Dumas pour la détermination de l'azote total, dans les blés, farines et issues de meunerie.

Ainsi, le fait que les écarts constatés, en macroanalyse, entre les chiffres fournis par la méthode de KJELDAHL et ceux obtenus par la méthode de DUMAS peuvent disparaître à l'échelle microanalytique grâce à l'emploi dans des conditions bien déterminées, d'oxydo-catalyseurs, associés aux catalyseurs, nous semble être le plus important de ceux que nous venons de signaler dans ce chapitre.

CHAPITRE VI

Oxydants

Depuis l'emploi du permanganate de potassium en poudre par KJELDAHL, en 1883, diverses substances oxydantes (permanganate de potassium en solution ; bichromate de potassium, persulfate de sodium, persulfate de potassium, etc.) ont été préconisées pour remplacer le permanganate.

LEVALTIER [70], après en avoir soigneusement dressé la liste, a, en 1924, confirmé l'opinion de DENIGÈS [22] qui, dès 1894, écrivait « les oxydants sont moins favorables à l'obtention de chiffres corrects que les réducteurs », et celle de VILLIERS et MOREAU-TALON [125] qui affirmaient « que l'oxydation violente détruit une partie de l'ammoniaque formée et que l'action des oxydants doit être limitée à la fin de l'opération ». LEVALTIER a, de plus, fait remarquer que « si, dans certains cas, l'oxydation peut être de quelque utilité, elle est forcément limitée aux corps qui ne contiennent pas dans leur molécule de groupements oxygénés de l'azote, ni de dérivés nitrés, ni de nitrates ».

Cependant, depuis 1924, il a été souvent fait usage d'oxydants, employés seuls ou en présence de catalyseurs ou d'élévateurs de température. Parmi les substances employées, celles qui furent utilisées le plus souvent, sont l'eau oxygénée et l'acide perchlorique. Nous avons, pour la clarté de l'exposé, groupé les auteurs qui se sont servis

de méthodes semblables et divisé l'étude des oxydants en trois parties :

1. — Emploi de l'eau oxygénée,
2. — Emploi de l'acide perchlorique ou de perchlorates,
3. — Emploi d'oxydants divers, autres que les corps précédents.

1. — EMPLOI DE L'EAU OXYGENEE.

A la suite de JUSTIN-MUELLER [54] qui, ainsi que l'a rappelé LEVALTIER, se servit, en 1915, d'eau oxygénée pour la détermination de l'azote urinaire, BERMAN et LAUFER [7] utilisèrent, en 1924, pour doser l'azote dans le malt, l'action combinée de l'acide sulfurique, du sulfate de cuivre, du sulfate de potassium et de l'eau oxygénée, qui réduit considérablement la durée de la destruction. La même année, KOCH et Mac MEEKIN [58], en microanalyse, ont également employé l'eau oxygénée pour le dosage de l'azote dans différentes substances organiques et aussi dans le lait, l'urine et le sang.

KULTUGIN et GUBAREFF [61], en 1926, après avoir rappelé que, dans les déterminations d'azote par chauffage avec l'acide sulfurique, il pouvait exister des erreurs dues, soit à un chauffage trop prolongé, causant une perte d'ammoniac, soit à un chauffage insuffisant, ont pratiqué, en microanalyse, des additions d'eau oxygénée concentrée, après début d'attaque sulfurique. La même année, FOIT [35], pour le dosage de l'azote dans l'urine et dans le sang, a effectué la minéralisation sulfurique en présence d'eau oxygénée.

Celle-ci fut également employée, en 1927, par PITTARELLI [94] et par BOUYER [10], ainsi que nous l'avons signalé à propos des réducteurs, de même que par GOLUB [40] pour la détermination quantitative de l'azote dans les aliments.

Pour doser l'azote total de la farine, SACCARDI [101], en 1928, a ajouté au mélange : substance + acide sulfurique contenant 5 p. 100 d'anhydride sulfurique, chauffé 20 minutes; puis refroidi, du perhydrol.

En 1929, CHRISTENSEN et FULMER [15], pour la levure, ont employé l'eau oxygénée associée au sulfate de potassium, au sulfate de cuivre et à l'acide sulfurique. La même année, PROVEDI [97] montra que, pour la farine, la décoloration se fait avec :

$\text{PO}^4\text{H}^3 + \text{SO}^4\text{H}^2$ en 6 h. 30,
agents réducteurs en 6 h. 30;
 $\text{PO}^4\text{H}^3 + \text{SO}^4\text{H}^2 + \text{SO}^4\text{K}^2$ en 5 h. 30,
 MnO^4K en 3 h. 30,
 O^2Ba en 3 heures,
 O^2IF^2 en 45 minutes.

Les résultats obtenus en ayant soin de poursuivre l'ébullition 45 minutes après décoloration, ont été pratiquement identiques. En 1929, également, LUNDIN et ELLBURG [72], pour la destruction de 1-2 g. de farine, conseillèrent l'emploi de 10-20 cm³ d'eau oxygénée, 0 g., 4 à 0 g. 5 de cuivre, et 10 cm³ d'un mélange de :

SO^4H^2 concentré 3 volumes,
 PO^4H^2 à 85 p. 100 2 volumes,
 SO^4K^2 7 à 8 g.

L'eau oxygénée a été encore utilisée en 1931 par ALLEN [1], pour la détermination de l'azote de la caféine dans le café décaféiné, et par MYERS [89] puis, en 1933, par STEINHOFF [117], pour le dosage de l'azote dans les amidons.

En 1933, CASE et PRICE [13], dosant l'azote dans la levure, comparèrent les résultats donnés par la technique de CHRISTENSEN et FULMER [15], que nous avons citée ci-dessus. D'après ces auteurs, la méthode de KJELDAHL conduit à des résultats trop faibles et la quantité d'azote trouvée par la technique de CHRISTENSEN et FULMER dépend de la quantité d'eau oxygénée ajoutée pendant l'attaque de la levure et il existe une quantité optima d'eau oxygénée à employer.

En 1934, ISELIN [49], en vue du microdosage de l'azote dans les matières alimentaires, a utilisé pour 0 g. 1 à 0 g. 05 de substance :

2 cm³ SO⁴H² pur,
2 cm³ sol. d'O²H² à 15 p. 100,
0 cm³ 5 sol. de SO⁴Cu.

Enfin, la même année, JENDRASSIK et CLEGHORN [51] se sont également servis d'eau oxygénée pour la détermination de l'azote non protéique.

2. — EMPLOI DE L'ACIDE PERCHLORIQUE OU DE PERCHLORATES.

C'est en 1888 que, le premier, STCHERBAK (116) a utilisé pour détruire la matière organique, en vue du dosage de l'azote, de petites quantités de perchlorate de potassium cristallisé, à la place du permanganate de potassium dont, dès 1883, KJELDAHL, dans le même but, « ajoutait un excès, après avoir chauffé la matière azotée avec une quantité suffisante d'acide sulfurique concentré jusqu'à une température voisine du point d'ébullition de l'acide ».

« Je n'ai fait la substitution du perchlorate de potassium au permanganate, disait STCHERBAK, qu'après qu'une série d'analyses de contrôle m'eût montré que, très avantageuse au point de vue technique, elle n'influaient en rien sur la précision des résultats ».

Mais en 1895, MOREIGNE [88] montra que :

1° L'usage du perchlorate de potassium, pour favoriser l'oxydation dans le dosage de l'azote total par la méthode de KJELDAHL, donne lieu, d'une façon constante, à une perte d'azote pendant la combustion.

2° Pour une même quantité de perchlorate de potassium, la perte est sensiblement proportionnelle au sulfate d'ammonium formé, c'est-à-dire à la quantité d'azote de l'essai.

3° Inversement, pour une même quantité d'azote, la perte est proportionnelle au perchlorate de potassium employé, jusqu'à une certaine limite maxima, variable elle-même avec le sulfate d'ammonium en présence.

4° Cette perte maxima se rapproche du quart de l'azote total, tout en lui étant, d'une façon générale, légèrement supérieure.

En 1921, MEARS et HUSSEY [80], après avoir rappelé que l'acide perchlorique à 66 p. 100 exerçait une action corrosive sur les matières organiques, et que la combinaison de l'acide sulfurique, de l'acide perchlorique et des matières organiques amenait, seulement, au plus, une rapide déflagration, obtinrent de bons résultats en utilisant pour la minéralisation de 1 g. de substance (caséine, albumine d'œuf, gélatine, sang desséché, farine de graine de colza, coques de cacao, rognures d'ongles), 2 cm³ d'acide perchlorique à 66 p. 100, 25 cm³ d'acide sulfurique concentré et 1 g. de sulfate de cuivre, et en prolongeant le chauffage au moins 15 minutes après éclaircissement. Ces auteurs ont signalé, en outre, que l'emploi de plus de 2 cm³ d'acide perchlorique par gramme de substance à détruire, causait des pertes d'azote et que, dans le cas de l'urine, il ne fallait pas dépasser, pour une prise d'essai de 10 cm³, 0 cm³ 5 d'acide perchlorique.

La même année, PARKER et TERRELL [92] employèrent, pour 0 g., 8 d'échantillon, 15 cm³ d'acide sulfurique concentré, 1 g. de sulfate de cuivre, 6 cm³ d'acide perchlorique (d. 1,12). Ce procédé donne de bons résultats et diminue considérablement le temps de digestion.

En 1925, ROSE [100], en se servant, pour une quantité de produit renfermant de 0,25 à 2 mg., d'azote, de 1 cm³ du mélange de 100 cm³ d'acide sulfurique concentré et 160 cm³ d'acide perchlorique à 66 p. 100, amené à 500 cm³ avec de l'eau exempte d'ammoniaque et de quelques gouttes de perhydrol dilué au cinquième, obtint, après dosage par nesslerisation, des résultats satisfaisants avec l'urée, l'indol, l'allantoïne, l'acide urique, l'acide orthoaminobenzoïque, le glycocole, le sang, le sérum, mais ne put doser tout l'azote de la guanidine et de la créatinine.

YOE [134], en 1925 également, utilisa avec succès le procédé de MEARS et HUSSEY en le modifiant ainsi : à 2 g. de substance finement pulvérisée, transvasée dans un matras

de KJELDAHL de 500 cm³, il ajoute environ 0 g., 50 de sulfate de cuivre, 25 cm³ d'acide sulfurique concentré (d. 1,83) et 2 cm³ d'acide perchlorique à 66 p. 100. D'après YOE « les analyses faites sur une grande variété de substances organiques montrent que la présence d'une petite quantité de cet acide laisse à la méthode KJELDAHL toute son exactitude ».

En 1927, LEMATTE, BOINOT et KAHANE [67], dosant les minéraux contenus dans les principaux organes utilisés en opothérapie, passèrent à la destruction de plus grandes quantités de substances organiques et employèrent, pour minéraliser 10 g. de substance desséchée et pulvérisée, 50 cm³ du mélange :

Acide sulfurique pur à 66°	350 cm ³
Acide perchlorique d. 1,615	650 cm ³

Le mode opératoire, indiqué par ces auteurs, consistait à ajouter au mélange oxydant, préalablement introduit dans un ballon de KJELDAHL en Pyrex de 250 cm³, une prise de 2 g. de poudre d'organes, puis à chauffer lentement au bain de sable jusqu'à désagrégation. La masse noircit et mousse. Après refroidissement de 2 minutes, on ajoute une deuxième prise de 2 g. et on répète les mêmes opérations jusqu'à ce que les 10 g. soient introduits. A partir de ce moment, on chauffe à feu nu avec un bec Bunsen. La liqueur se décolore et devient tout à fait limpide. On continue à chauffer jusqu'à l'élimination de l'acide perchlorique et l'apparition des vapeurs blanches d'acide sulfurique. Ce résultat est obtenu, selon la nature des organes, en 30 à 60 minutes. L'azote est dosé, sur 2 cm³ de la liqueur, par la formoltitration avec la correction de RONCHÈSE.

De plus, les auteurs ont fait remarquer qu'en suivant cette technique, l'emploi de l'acide perchlorique est sans danger.

La même année, DUPRAY [26] a utilisé, pour la détermination de l'azote non protéique, un mélange de SO^4H^2 , PO^4H^3 et ClO^4H .

En 1928, FREY, JENKINS et JOSLIN [36], pour le dosage de l'azote total dans les cuirs, obtinrent des résultats identiques en employant comme adjuvant l'oxyde de mercure, le sulfate de cuivre ou le perchlorate de potassium. La même année, CHILES [14] a préconisé le mélange suivant :

70 cm³ acide sulfurique concentré,
50 cm³ eau,
20 cm³ acide perchlorique à 20 p. 100,
15 g. sulfate de sodium,
1 g. sulfate de cuivre,

pour minéraliser certaines substances biologiques (sang, lait, etc.), en vue du dosage de l'azote par nesslerisation.

En 1931, WIRBEL [131] a conseillé l'emploi de l'acide perchlorique pour le dosage de l'azote total urinaire, suivant le mode opératoire ci-dessous :

A 1 cm³ d'urine, placé dans un tube à essai en Pyrex ou dans une capsule de quartz, il est ajouté 1 à 2 cm³ d'acide sulfurique pur à 66° B, un petit morceau de bisulfate de potassium de 4 à 6 gouttes d'acide perchlorique. Le tout est chauffé rapidement jusqu'à la décoloration, obtenue généralement en 7 à 8 minutes. L'attaque est continuée quelques minutes et l'ammoniaque formée dosée par formol titration.

En 1932, FUCHS et FALKENHAUSEN [39], pour déterminer l'azote non protéique du sérum, ont minéralisé le filtrat trichloracétique, à l'aide d'un mélange d'acide sulfurique et de 0,4 p. 100 d'acide perchlorique.

En 1933, pour le dosage microanalytique de l'azote dans les plantes, DONEEN [23] s'est servi d'acide perchlorique comme agent oxydant. Puis, JOHNSON [52] a utilisé une attaque avec l'acide sulfurique et l'acide perchlorique à 66 p. 100 pour le dosage de l'azote dans les aciers.

La même année, FISZERMANN et Mme FISZERMANN [31], dosant l'azote dans les poudres de rein et de foie, proposèrent de modifier la technique de destruction sulfo-per-

chlorique de LEMATTE, BOINOT et KAHANE de la façon suivante : « au lieu d'ajouter la poudre d'organes par petites portions, il est possible d'éviter cette dernière opération, qui expose à des pertes de substance, en introduisant la totalité de la prise d'essai de poudre d'organes dans le ballon de KJELDAHL, dans lequel on a mis préalablement le mélange acide. On agite le tout de façon à former une bouillie homogène. On laisse macérer pendant quelques minutes en agitant de temps en temps. On chauffe. Il se forme une mousse abondante. On cesse de chauffer ; la mousse tombe peu à peu. On agite le matras pour faciliter la chute de la mousse. Dès ce moment, on chauffe fortement jusqu'à la décoloration du mélange ».

En suivant cette technique, la destruction complète peut s'effectuer en 40 minutes. Mais, les chiffres d'azote obtenus sont très inférieurs à ceux des autres méthodes de destruction par voie humide. Parmi ces dernières, c'est la technique employant simultanément $\text{SO}^4\text{H}^2 + \text{SO}^4\text{Cu} + \text{SO}^4\text{K}^2$ qui a donné les résultats les plus élevés.

Voici, d'ailleurs, quelques chiffres publiés par ces auteurs :

MÉTHODE DE DESTRUCTION	DURÉE MOYENNE DE LA DESTRUC- TION	SO^4H^2 n/10 NEUTRALISÉ EN cm^3	N CORRES- PONDANT EN G. P. 100 G. DE POUDRE
$\text{SO}^4\text{H}^2 + \text{SO}^4\text{Cu} + \text{SO}^4\text{K}^2$	3 h. 20	13,15	10,32
$\text{SO}^4\text{H}^2 + \text{ClO}^4\text{H}$	0 h. 45	9	7,2

Enfin, en 1934, KITTO [53] a proposé l'addition de séléniate de sodium au mélange de CHILES pour l'analyse des farines.

3. — EMPLOI D'OXYDANTS AUTRES QUE L'ACIDE PERCHLORIQUE ET L'EAU OXYGENEE.

En 1927, BROWN [11] s'est servi de l'acide chromique pour le dosage de l'azote dans les engrais.

En 1929, EMMERT [29] a utilisé le chlorate de sodium, associé à l'acide sulfurique à 50 p. 100 en volume, pour déterminer l'azote total dans les sols et les tissus végétaux. La même année, WHITTAKER [130] a choisi le permanganate de potassium comme adjuvant oxydant pour le dosage de l'azote dans le charbon.

Ainsi, depuis 1924, les oxydants, abandonnés, comme le rappelle MESTREZAT, depuis 1903 et surtout, parmi eux, l'acide perchlorique et l'eau oxygénée, ont été fréquemment employés pour le dosage de l'azote dans les matières organiques, la plupart du temps dans des substances biologiques.

L'acide perchlorique, qui permet une destruction rapide, a donné des résultats corrects à la majorité des auteurs qui l'ont utilisé pour la détermination de l'azote, à condition qu'il soit employé à de faibles doses. Cependant, la dernière observation que nous avons signalée au sujet de l'emploi de cet oxydant, nous a incitée à essayer de fixer d'une manière plus précise les conditions d'emploi de cet adjuvant.

DEUXIEME PARTIE

**CONDITIONS D'EMPLOI DE L'ACIDE
PERCHLORIQUE POUR LA
DESTRUCTION DES MATIERES
ORGANIQUES, EN VUE DU DOSAGE
DE L'AZOTE**

Introduction

Nous avons d'abord envisagé l'emploi de l'acide perchlorique à 66 p. 100 seul, mais, nous avons obtenu un échec complet, la destruction s'effectuant trop lentement pour présenter un intérêt quelconque, lors de l'emploi de quantités de substance dépassant l'ordre de traces. D'autre part, le terme de la destruction était très difficile à saisir en raison de la couleur jaunâtre du contenu du matras, due, en particulier, aux produits chlorés, résultant de la décomposition spontanée que subit l'acide perchlorique à l'ébullition. Nous n'avons donc pas poussé plus loin ces essais et, dès lors, nous n'avons plus utilisé l'acide perchlorique qu'en association avec l'acide sulfurique, ainsi que nous allons maintenant l'exposer.

Nous avons divisé en cinq chapitres cette deuxième partie, chacun d'eux relatant les différents points envisagés dans les conditions d'emploi de l'acide perchlorique.

En voici le plan :

— REMARQUES PRÉLIMINAIRES : témoin des essais ; titrage de l'ammoniaque ; pureté des réactifs.

— CHAPITRE I. — Action de l'acide perchlorique sur les sels ammoniacaux.

— CHAPITRE II. — Influence de la quantité d'acide perchlorique employée.

— CHAPITRE III. — Influence de la concentration de l'acide employé.

— CHAPITRE IV. — Influence du moment d'introduction de l'acide perchlorique.

— CHAPITRE V. — Influence de la durée de l'ébullition après décoloration du liquide de destruction.

— CONCLUSIONS.

Remarques Préliminaires

TEMOIN

Dans les essais que nous avons effectués pour établir une technique de destruction des matières organiques, utilisant l'acide perchlorique à 66 p. 100, nous avons déterminé, au préalable, le pourcentage d'azote des corps employés, par destruction sulfurique simple.

TITRAGE DE L'AMMONIAQUE

Nous avons dosé l'ammoniaque formée par déplacement. A cet effet, nous nous sommes servie d'un appareil d'Aubin, en Pyrex, auquel était adjoind un générateur de vapeur d'eau, selon les indications de PÉNAU et GAUDUCHON. Cet appareil est représenté sur le schéma ci-contre (voir fig. 1). Le liquide provenant de la destruction de la matière organique et les eaux du rinçage du matras de KJELDAHL étaient additionnés d'un excès d'une solution de soude à 40 p. 100, préparée par nous, à partir de soude caustique en cylindres à l'alcool.

L'ammoniaque était titrée, au fur et à mesure de son entraînement, par de l'acide sulfurique n/10 en présence de quelques gouttes d'alizarine sulfonate de sodium, sen-

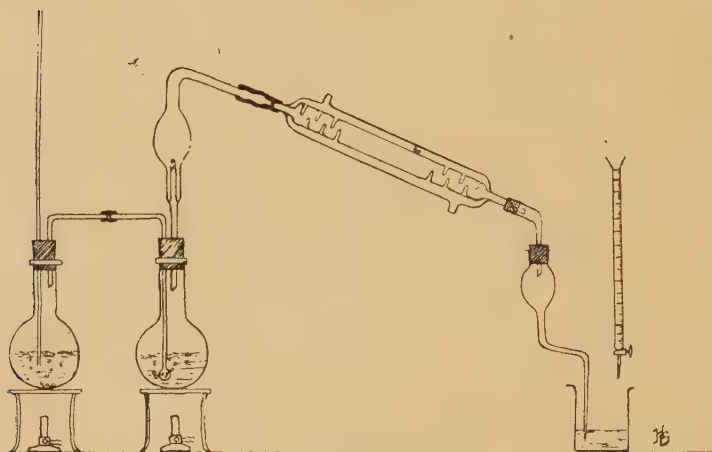


Fig. 1.

sibilisée selon la technique de MESTREZAT [82]. Cet indicateur vire nettement en présence de NH^3 et n'est pas influencé par le CO^2 .

REACTIFS

Nous avons employé, pour tous nos dosages, de l'eau bidistillée, la deuxième distillation étant pratiquée dans l'appareil en quartz de CLIQUET, GUILBERT et PÉNAU [16].

La pureté de nos réactifs a été éprouvée, en constatant l'absence d'ammoniaque après destruction de 1 g. de glucose pur.

CHAPITRE PREMIER

Action de l'acide perchlorique sur les sels ammoniacaux

Nous avons d'abord voulu nous rendre compte de l'influence d'un excès d'acide perchlorique sur l'ammoniaque provenant de la destruction des matières organiques. A cet effet, nous avons ajouté à 5 cm³ d'une solution de chlorhydrate d'ammonium, correspondant à 18 cm³ 75 d'acide sulfurique décinormal, 15 cm³ d'acide sulfurique pur, d. 1,83, et, suivant les cas, 1 cm³, 0 cm³ 5, 0 cm³ 2 d'acide perchlorique à 66 p. 100, puis chauffé le tout à l'ébullition pendant 45 minutes. Nous avons ensuite titré l'ammoniaque entraînée par déplacement, après addition de soude à 40 p. 100.

Nous avons ainsi constaté que le déficit d'ammoniaque est proportionnel à l'excès d'acide perchlorique ainsi que le montre le tableau ci-joint (voir tableau I).

TABLEAU I.

NH ⁴ Cl	SO ⁴ H ² d. 1,83. EN CM ³	ClO ⁴ H ² à 66 p. 100 EN CM ³	SO ⁴ H ² n/10 EN CM ³	NH ³ PERDU P. 100
5 cm ³ de solution correspon- dant à 18 cm ³ 75 de SO ⁴ H ² n/10	15	1	14,55	22,4
	15	0,5	15,47	17,4
	15	0,2	16,89	9,9
	15	0,2 mis gtte à gtte après 15 mi- nutes d'atta- que sulfuri- que.	16,90	9,8

Cela ne fait que confirmer les essais effectués par MOREL-ONE [88], avec le perchlorate de potassium, dont nous avons parlé plus haut.

Nous avons ensuite recommencé ces expériences en ajoutant dans chaque cas, 1 g. de glucose, et nous avons constaté alors que l'acide perchlorique est employé uniquement à la destruction du glucose et que nous n'observons plus ici les déficits signalés ci-dessus (voir tableau II).

TABEAU II.

NH ⁴ Cl	GLUCOSE EN G.	SO ⁴ H ² d. 1,83 EN cm ³	ClO ⁴ H A 66 P. 100 EN cm ³	SO ⁴ H ² n/10 EN cm ³
5 cm ³ de solution correspon- dant à	1	15	1	18,52
13 cm ³ 75	1	15	0,5	18,65
de SO ⁴ H ²	1	15	0,2	18,70
n/10	1	15	0,2 mis gtte à gtte après 15 mi- nutes d'atta- que sulfuri- que.	18,65

Il ressort de tous ces essais que lorsque tout l'azote de la matière organique a été transformé en ammoniacque, il ne doit plus y avoir d'acide perchlorique en excès, afin d'éviter toutes pertes d'azote. Cela ne fait que justifier les indications de MEARS et HUSSEY dont nous avons parlé plus haut, et explique les résultats trop faibles obtenus par FISZERMANN et Mme FISZERMANN-GARBER, lors de l'emploi du mode de destruction sulfo-perchlorique. Nous allons d'ailleurs revenir sur ce point important dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II

Influence de la quantité d'acide perchlorique employée

A la suite des observations précédentes, nous avons été amenée à penser que nous pourrions obtenir de bons résultats, au moyen de l'attaque sulfo-perchlorique, en n'utilisant que la quantité d'acide perchlorique strictement nécessaire pour la destruction de la matière organique.

A cet effet, après avoir chauffé le corps organique azoté et l'acide sulfurique jusqu'à ébullition, nous avons ajouté l'acide perchlorique à 66 p. 100, goutte à goutte, à raison d'une goutte par minute, jusqu'à décoloration du contenu du matras de KJELDAHL. Il se produit, à chaque addition, une très légère déflagration dans le matras, mais l'opération est sans aucun danger.

Voici le détail de nos essais et les résultats que nous avons obtenus :

Dans un matras de KJELDAHL, en verre Pyrex, de 250 cm³, nous avons placé :

0 g., 200 d'acide hippurique,
10 cm³ d'acide sulfurique conc. d. 1,83,
Une bille de verre.

Nous avons laissé l'attaque s'amorcer quelque peu, puis ajouté, goutte à goutte, sans interrompre l'ébullition, de l'acide perchlorique pur à 66 p. 100. L'addition de XV gouttes de cet acide, à raison d'une goutte par minute, fut suffisante pour amener la décoloration du mélange. Nous avons ensuite maintenu l'ébullition pendant 50 minutes.

La quantité d'acide sulfurique n/10 nécessaire pour saturer l'ammoniaque formée au cours de l'opération fut de 11 cm³ 15, ce qui correspond à un pourcentage en azote de 7,81, alors que le chiffre d'azote théorique est de 7,82 p. 100.

Nous avons ensuite recommencé la même opération, mais, après avoir obtenu la décoloration du mélange, nous avons ajouté, goutte à goutte, un excès de V gouttes d'acide perchlorique. Dans ce cas, nous avons trouvé :

azote total : 7,24 p. 100.

Pour un excès de X gouttes, après décoloration, nous avons obtenu :

azote total : 5,88 p. 100.

Des expériences conduites, de la même façon, avec de l'uréthane et un échantillon de caséine, nous ont donné les résultats indiqués dans le tableau III.

TABLEAU III.

GORPS EMPLOYÉS	QUANTITÉ DE ClO ⁴ H EMPLOYÉE	N TROUVÉ p. 100
URÉTHANE		
Prise d'essai : 0 g., 150	V gouttes (quantité nécessaire pour décolorer).	15,58
N KJELDAHL : 15,56	X gouttes	13,52
CASEINE		
Prise d'essai : 0 g., 200	X gouttes (quantité nécessaire pour décolorer).	13,97
N KJELDAHL : 13,96	XX gouttes.	12,22

Il faut donc, d'après cela, ne pas dépasser la quantité d'acide perchlorique, strictement nécessaire pour obtenir la décoloration. Cela peut être réalisé en ajoutant, goutte à goutte, de l'acide perchlorique dans le liquide de destruction bouillant jusqu'à ce que celui-ci soit décoloré.

CHAPITRE III

Influence de la concentration de l'acide employé

Nous avons pensé, afin d'éviter l'emploi d'un excès d'acide perchlorique, ajouter, goutte à goutte, dans les conditions définies dans le paragraphe précédent, de l'acide perchlorique dilué, espérant, de cette façon, mieux doser la quantité d'oxydant nécessaire et suffisante.

Nous avons effectué, comparativement, des destructions en ajoutant, comme plus haut, de l'acide perchlorique pur et de l'acide perchlorique dilué au 1/3 en volume avec de l'eau bidistillée ; dans tous les cas, l'ébullition était prolongée pendant 30 minutes après la décoloration.

En ce qui concerne la caséine, les meilleurs résultats ont été obtenus en employant l'acide perchlorique dilué au 1/3.

Pour l'uréthane et pour l'acide hippurique, nous n'avons pas obtenu de différences appréciables (voir tableau IV).

L'exemple de la caséine nous a montré qu'il était préférable d'employer l'acide perchlorique dilué au 1/3.

TABLEAU IV.

CORPS EMPLOYÉS	N TROUVÉ PAR :		
	KJELDAHL	ClO ⁴ H PUR	ClO ⁴ H AU 1/3
ACIDE HIPPIRIQUE:	7,86	7,66	7,65
Prise d'essai :		7,71	7,68
0 g., 250		7,72	7,69
URETHANE :	15,56	15,58	15,59
Prise d'essai :		15,52	15,57
0 g., 150			
CASEINE :	13,96	13,77	13,86
Prise d'essai :		13,88	13,92
0 g., 200		13,76	13,97
		13,78	13,94

CHAPITRE IV

Influence du moment d'introduction de l'acide perchlorique

Nous avons vu plus haut que tous les auteurs qui avaient employé l'acide perchlorique pour le dosage de l'azote, l'avaient ajouté, à froid, à l'acide sulfurique, avant de commencer la destruction. Nous avons, pour notre part, pratiqué des additions d'acide perchlorique, goutte à goutte, après début d'attaque sulfurique, ce qui a le double avantage de permettre d'employer la quantité d'acide perchlorique strictement nécessaire et de raccourcir notablement la durée de la destruction.

Ces additions ont été d'abord pratiquées au mélange acide sulfurique + substance à détruire, préalablement refroidi; le chauffage étant, pour ce faire, arrêté quelques instants; ensuite, après addition d'une goutte d'acide perchlorique dilué au 1/3, le mélange était de nouveau porté à ébullition, puis refroidi et ainsi de suite jusqu'à décoloration. Les résultats obtenus dans ce cas et consignés ci-dessous sont trop faibles.

Nous avons pensé, à ce moment, ajouter l'acide perchlorique dilué dans le liquide sulfurique sans interrompre

l'ébullition. Les chiffres d'azote, dans ce cas, sont satisfaisants ainsi que le montre le tableau V.

TABEAU V.

CORPS EMPLOYÉS	MOMENT D'INTRODUCTION DE L'ACIDE PERCHLORIQUE DILUÉ.	N TROUVÉ P. 100
ACIDE HIPPU- RIQUE : Prise d'essai : 0 g., 250 N KJELDAHL : 7,86	à l'ébullition	7,81
	—	7,85
	après refroidissement	7,64
	—	7,61
URETHANE : Prise d'essai : 0 g., 150 N KJELDAHL : 15,56	à l'ébullition	15,58
	—	15,52
	après refroidissement	15,43
	—	15,43
CASEINE : Prise d'essai : 0 g., 200 N KJELDAHL : 13,96	à l'ébullition	13,92
	—	14,01
	après refroidissement	13,86
	—	13,84

La question qui se présentait alors à nous était la suivante : fallait-il pratiquer des additions d'acide perchlorique dilué tout au début de l'attaque sulfurique ou après une certaine durée d'action de l'acide ?

Dans le but de répondre à cette question, nous avons ajouté la quantité d'acide perchlorique au 1/3 strictement nécessaire pour décolorer après des temps variables d'at-

taque sulfurique. Dans tous ces essais, l'ébullition était prolongée 30 minutes après la décoloration.

Nous avons constaté de faibles variations, mais il nous a semblé que les meilleurs résultats étaient obtenus en ajoutant l'acide perchlorique dilué au 1/3, de 10 à 15 minutes après début d'attaque sulfurique (voir tableau VI).

TABLEAU VI.

CORPS EMPLOYÉS.	ADDITION D'ACIDE PERCHLORIQUE AU 1/3, APRÈS :	N TROUVÉ P. 100
ACIDE HIPPU- RIQUE :	Début d'ébullition	7,72
Prise d'essai :	10 minutes d'ébullition	7,81
0 g., 250		
N KJELDAHL :	15 — —	7,85
7,86	30 — —	7,68
URETHANE :	1 — —	15,54
Prise d'essai :	5 — —	15,59
0 g., 150		
N KJELDAHL :	10 — —	15,57
15,56	30 — —	15,53
CASEINE :	1 — —	14,01
Prise d'essai :	15 — —	14,01
0 g., 200		
N KJELDAHL :	30 — —	13,96
13,96		

CHAPITRE V

Influence de la durée de l'ébullition après décoloration du liquide de destruction

Dans tous les essais précédents, nous avons maintenu, arbitrairement, l'ébullition pendant 30 minutes après la décoloration du contenu du matras de KJELDAHL. En effet, de nombreux auteurs, employant des modifications de la méthode de KJELDAHL, et notamment, parmi eux, HOPPE-SEYLER [47], KRÜGER [60], FOERSTER [34], MILBAUER [87], FLAMAND et PRAGER [32], ANDERSEN et JENSEN [2], ont recommandé de ne pas arrêter l'attaque sulfurique tout de suite après la décoloration.

MESTREZAT et Mlle JANET [84] indiquent, au sujet du dosage de l'azote total urinaire par la technique de DENIGÈS, que l'attaque gagne à être prolongée après décoloration, un temps égal à celui qui s'est écoulé depuis le début de l'expérience. D'après les dosages effectués par ces auteurs, les chiffres ainsi obtenus peuvent être supérieurs de 0,2 à 3,4 p. 100 à ceux trouvés en s'arrêtant à la décoloration.

LEVALTIER [70] a, de son côté, montré, en dosant l'azote total de la caséine au moyen du mélange $\text{SO}^4\text{H}^2 + \text{PO}^4\text{H}^3$

+ SO^4K^2 , employé seul ou après addition de SO^4Cu , SO^4Hg ou SO^4Fe , qu'en aucun cas, la décoloration n'était un signe de transformation de l'azote en ammoniaque.

KEER [55], pour la détermination de l'azote dans les viandes par la méthode de KJELDAHL-GUNNING-ARNOLD, a indiqué que le chauffage devait être continué une heure après la clarification du mélange.

PROVEDI [97], utilisant l'eau oxygénée pour doser l'azote dans la farine, a conseillé de poursuivre l'ébullition pendant 45 minutes après la décoloration.

BOIVIN [8], pour sa part, a pu écrire : « Aussi bien en microanalyse qu'en macroanalyse, il convient, dans une technique générale pour le dosage de l'azote par KJELDAHL, de prolonger très nettement le chauffage au delà de la décoloration de l'acide sulfurique, puisque cette décoloration n'implique aucunement que la minéralisation de l'azote soit achevée. »

LEMOIGNE, DÉSVEAUX et MONGUILLON [68] ont, de leur côté, montré que, dans le cas de la caséine, lors de l'emploi de la technique de GÜNNING, le chauffage devait être prolongé de 3 à 4 heures après la décoloration.

La considération de ces importantes observations nous a amenée à déterminer, dans le cas qui nous occupait, l'influence de la prolongation de la durée de l'ébullition, après la décoration, sur le résultat final en azote.

A cet effet, nous avons pratiqué des destructions sur l'acide hippurique, l'uréthane, la caséine, en ajoutant goutte à goutte, après début d'attaque sulfurique, de l'acide perchlorique à 66 p. 100 dilué au 1/3. Nous avons arrêté l'opération, dans certains cas, tout de suite après décoloration, et dans d'autres, 15, 30, 45 minutes après décoloration.

Les résultats ainsi obtenus sont indiqués dans le tableau VII.

TABLEAU VII.

CORPS EMPLOYÉS	DURÉE D'EBULLITION APRÈS DÉCOLORATION en minutes	N TROUVÉ P. 100
ACIDE HIPPU- RIQUE :	0	7,69
Prise d'essai :	5	7,75
0 g., 250	10	7,74
N KJELDAHL :	15	7,71
7,86	30	7,75
	45	7,71
	60	7,77
URETHANE :	2	15,57
Prise d'essai :	5	15,59
0 g., 150	15	15,54
N KJELDAHL :	20	15,53
15,56	45	15,56
CASEINE :	0	14,02
Prise d'essai :	15	13,97
0 g., 200	—	14,01
N KJELDAHL :	30	13,92
13,96	—	13,91
	—	13,94

Ainsi, il semble bien qu'au moment de la décoloration du mélange de destruction, tout l'azote soit passé à l'état d'ammoniaque, ce qui peut s'expliquer par l'action intense exercée par l'acide perchlorique.

De plus, en ce qui concerne les corps que nous avons considérés, l'ébullition peut être maintenue pendant une heure sans risque de perte d'azote puisqu'il n'a été employé que la quantité d'acide perchlorique nécessaire et suffisante et qu'ainsi, il ne peut y avoir un excès d'acide perchlorique qui pourrait agir sur le sel ammoniacal formé.

Cela permet, dans le cas de molécules particulièrement résistantes, de prolonger, si l'on en juge à propos, l'ébullition pendant un certain temps au delà de la décoloration.

Conclusions

D'après les résultats exposés ci-dessus, obtenus avec l'acide hippurique, l'uréthane et la caséine, il nous a semblé possible d'utiliser, pour la détermination quantitative de l'azote, le mode de destruction sulfo-perchlorique, qui offre le grand avantage de permettre une minéralisation rapide, dans des conditions bien déterminées, que nous avons établies plus haut et groupées dans le mode opératoire ci-dessous :

Une prise d'essai d'environ 0 g., 200 de la substance à détruire est placée dans une fiole de KJELDAHL, en verre Pyrex, de 150 ou 200 cm³, avec 25 cm³ d'acide sulfurique pur, de densité 1,83. Le mélange est alors porté à l'ébullition et celle-ci est maintenue 10 à 15 minutes après noircissement du liquide. L'acide perchlorique à 66 p. 100 dilué au 1/3 avec de l'eau bidistillée, est ajouté, goutte à goutte, dans le mélange maintenu bouillant, jusqu'à obtention de la décoloration. L'ébullition est alors continuée pendant 15 minutes environ.

L'ammoniaque est titrée après déplacement par la soude au fur et à mesure de son entraînement par la vapeur d'eau, en présence d'alizarine sulfonate de sodium, sensibilisée suivant la technique de MESTREZAT.

Nous avons voulu étendre cette technique de dosage à d'autres corps chimiquement définis. L'énumération de ces substances, les résultats que nous avons obtenus, font l'objet du premier chapitre de la troisième partie de cet exposé, le deuxième chapitre étant consacré à l'emploi du mode de destruction sulfo-perchlorique pour la détermination quantitative de l'azote dans différentes substances biologiques.

TROISIEME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

Application du mode de destruction sulfo-perchlorique au dosage de l'azote dans des corps chimiquement définis

A. — REMARQUES GENERALES.

Nous avons tout d'abord appliqué le mode de destruction sulfo-perchlorique à des corps dont l'azote est facilement dosable par la méthode de KJELDAHL.

Nos premiers essais ont été effectués sur des amides : urée, diéthylmalonylurée, acétanilide, méthylacétanilide, oxyéthylparaacétanilide ; des dérivés aminés : hexaméthylènetétramine, paraaminobenzoate de butyle normal, acide sulfanilique, anilarsinate de sodium ; une imide : allylthiourée.

Malgré des résultats inconstants, nous avons voulu savoir ce que l'on obtiendrait en appliquant la destruction sulfo-perchlorique à des composés pour lesquels le dosage de l'azote est reconnu difficile ou impossible par la méthode de KJELDAHL. C'est ainsi que nous nous sommes adressée au chlorhydrate de bétaine, à l'antipyrine et au pyramidon.

Nous avons, pour chaque corps, comparé les chiffres obtenus par la destruction sulfo-perchlorique à ceux donnés par la méthode de TER MEULEN et les techniques de FLEURY et LEVALTIER et de LAURO que nous allons maintenant indiquer.

Méthode de Ter Meulen.

1. Principe.

Lorsqu'on chauffe un composé organique azoté dans un courant d'hydrogène, en présence de nickel, l'azote de la substance est transformé en ammoniaque.

2. Technique.

La substance, finement pulvérisée, est mélangée, aussi intimement que possible, avec du nickel, obtenu en chauffant dans un courant d'hydrogène de l'oxyde de nickel Ni^2O^3 , dans une nacelle en porcelaine E. Cette nacelle est introduite dans un tube de quartz AB (voir fig. 2), de 40 cm. de long et de 1 cm., 8 de diamètre intérieur. Le tube est placé lui-même dans une boîte en carton d'amiante CD ; la partie contenue dans la boîte est remplie de catalyseur (amiante nickelé) maintenu en place par deux tampons d'amiante.

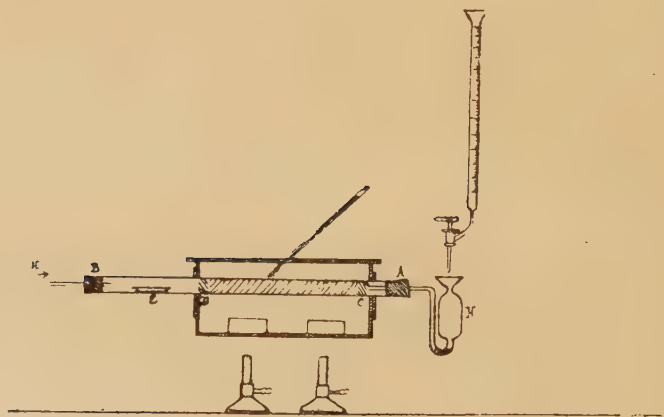


Fig. 2.

A l'extrémité du tube de quartz, se place un tube en entonnoir H, dans lequel on met quelques cm^3 d'eau distillée qui servent à retenir l'ammoniaque dégagée. Le titrage se fait dans ce tube, au fur et à mesure du passage de NH^3 , avec une burette placée au-dessus.

Avant de commencer l'analyse, on chauffe la boîte à 250° et on fait passer dans le tube un courant d'hydrogène purifié mais non séché ; on fait la lecture de la burette contenant l'acide titré, on fait tomber une goutte d'acide dans le tube H et on la teinte en rouge avec une goutte de méthylorange. Si la couleur ne vire pas au jaune après quelques minutes, on est sûr qu'il n'y a pas de matières azotées dans le tube et on introduit la nacelle E. On chauffe avec précaution la substance et on titre l'ammoniaque dégagée au fur et à mesure de sa formation.

Lorsqu'on doit analyser des substances contenant des halogènes ou du soufre, on remplace un peu d'amiante nickelé, près de D, par de la chaux sodée, qui a pour rôle de retenir l'hydrogène sulfuré et les acides halogénés.

Méthode directe ou type de Fleury et Levaltier.

Une quantité de 0 g., 10 à 0 g., 50 de matière à analyser, suivant la teneur supposée en azote, est introduite dans un ballon de KJELDAHL (en Pyrex) de 300 cm³ environ. On y ajoute successivement dans l'ordre : 5 g. de sulfate de potassium, 5 cm³ d'acide sulfurique pur d. 1,83, et 15 cm³ d'acide phosphorique d. 1,75. Le ballon est obturé par un entonnoir et le tout est mis à chauffer sur un bec Bunsen. Dans le cas d'une solution ou d'une urine, on prend environ 5 cm³ et il faut alors, de même que dans le cas de matières organiques dérivées des hydrates de carbone (glucosides), chauffer un peu moins fort pendant les dix premières minutes, à cause du départ de l'eau ; on chauffe vivement ensuite. Dans tous les cas, il faut chauffer 10 minutes encore après la décoloration.

Technique au sélénium.

Matière à analyser	0 g., 10-0 g., 50
Sélénium	0 g., 10
Sulfate de potassium	4 g.
Acide sulfurique pur, d. 1,83 ...	15 cm ³

Technique à l'acide sélénieux.

Matière à analyser	0 g., 10-0 g., 50
Acide sélénieux	0 g., 10
Sulfate de potassium	4 g.
Acide sulfurique pur, d. 1,83 ...	15 cm ³

L'ébullition est prolongée 30 minutes après la décoloration.

B: — RESULTATS OBTENUS.

1. — Urée.

Nous avons employé une solution aqueuse à 1 p. 100. Sur 5 cm³ de cette solution, c'est-à-dire sur 0 g., 05 d'urée, il a été effectué :

1° Une destruction sulfurique simple. Le mélange restant incolore, nous avons maintenu l'ébullition pendant une heure.

Pour saturer l'ammoniaque distillée, il a fallu employer 16 cm³ 1 de SO⁴H² n/10, ce qui correspond à N = 45,08 p. 100.

2° Une destruction sulfo-perchlorique. Le mélange ne noircissant pas, nous avons ajouté arbitrairement 11 gouttes d'acide perchlorique dilué au 1/3.

Dans ce cas, nous avons utilisé 16 cm³ 05 de SO⁴H² n/10. ce qui nous a donné N = 44,94 p. 100, soit, par rapport à la méthode de KJELDAHL, un rendement en azote de 99,6 p. 100.

3° La même opération a été refaite en présence de 0 g., 200 de glucose.

Nous avons obtenu, dans un premier essai : SO⁴H² n/10 = 16 cm³ 07, soit N = 44,99 p. 100, soit un rendement en azote de 99,8 p. 100, et, dans un deuxième essai : SO⁴H² n/10 = 16 cm³ 10 soit N = 45,08 p. 100, le rendement en azote est dans ce cas de 100 p. 100.

2. — Diéthylmalonylurée.

N p. 100 calculé = 15,21.

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN CM ³		
0,1719	18,63	15,16	99,6
0,1975	21,10	14,90	97,9
0,3406	36,50	15,00	98,5
0,3758	40,15	14,95	98,2
TECHNIQUE DE LAURO		15,28	100,4
TECHNIQUE A L'ACIDE SÉLÉNIEUX		15,17	99,7
MÉTHODE DE TER MEULEN		15,24	100,1

3. — Acétanilide.

N p. 100 calculé = 10,35.

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN CM ³		
0,1957	13,6	9,72	93,9
0,2033	14,1	9,7	93,7
0,2101	14,55	9,69	93,6
0,2630	18,25	9,71	93,8
TECHNIQUE DE FLEURY ET LEVALTIER		10,31	99,6
TECHNIQUE DE LAURO		10,36	100,09
TECHNIQUE A L'ACIDE SÉLÉNIEUX		10,35	100
MÉTHODE DE TER MEULEN		10,37	100,1

4. -- Méthylacétanilide.

N p. 100 calculé = 9,38.

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN cm ³		
0,1773	11,02	8,69	92,6
0,2195	13,6	8,67	92,4
0,2507	15,10	8,43	89,8
0,3210	19,5	8,50	91,6
TECHNIQUE DE FLEURY ET LEVAL- TIER		9,38	100
TECHNIQUE DE LAURO		9,32	99,3
MÉTHODE DE TER MEULEN		9,41	100,3

5. — Oxyéthylparaacétanilide.

N p. 100 calculé = 7,82.

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN cm ³		
0,1990	10,95	7,70	98,4
0,2436	12,87	7,39	94,5
0,3041	16,10	7,41	94,7
TECHNIQUE DE LAURO		7,83	100,1
TECHNIQUE A L'ACIDE SÉLÉNIEUX		7,81	99,8
MÉTHODE DE TER MEULEN		7,83	100,1

6. — Hexaméthylènetétramine.

N p. 100 calculé = 39,97.

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN CM ³		
0,0745	20,47	38,48	96,2
0,0745	20,56	38,63	96,6
0,0745	20,58	38,07	95,2
0,0745	21,20	39,08	99,5
TECHNIQUE DE LAURO		39,94	99,9

7. — Paraaminobenzoate de butyle normal.

N p. 100 calculé = 7,26.

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN CM ³		
0,1954	9,05	6,73	92,6
0,2190	10,1	6,70	92,2
0,2502	12,05	6,74	92,8
TECHNIQUE DE FLEURY ET LEVAL- TIER		6,80	93,6
TECHNIQUE DE LAURO		7,23	99,5
TECHNIQUE A L'ACIDE SÉLÉNIEUX		7,25	99,8
MÉTHODE DE TER MEULEN		7,25	99,8

8. — Acide sulfanilique.

N p. 100 calculé = 8,09

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN cm ³		
0,2093	11,55	7,72	95,4
0,2498	13,75	7,70	95,1
0,2760	15,25	7,73	95,5
0,3182	17,60	7,74	95,6
TECHNIQUE DE FLEURY ET LEVAL- TIER		7,85	97
TECHNIQUE DE LAURO		8,04	99,3
MÉTHODE DE TER MEULEN		5,46	67,4

9. — Anilarsinate de sodium.

N p. 100 calculé = 4,78.

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN cm ³		
0,3028	10,3	4,76	99,5
TECHNIQUE DE LAURO		4,80	100,4
TECHNIQUE A L'ACIDE SELÉNIEUX		4,80	100,4
MÉTHODE DE TER MEULEN		4,75	99,3

10. — Allylthiourée.

N p. 100 calculé = 24,1.

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN cm ³		
0,1560	26,5	23,77	98,6
0,2091	34,9	23,36	96,9
TECHNIQUE DE FLEURY ET LEVAL- TIER		24,05	100,2
TECHNIQUE DE LAURO		24,15	99,7
MÉTHODE DE TER MEULEN		24,06	99,8

11. — Chlorhydrate de bétaine.

N p. 100 calculé = 9,11.

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN cm ³		
0,1625	8,20	7,06	77,4
TECHNIQUE DE LAURO		8,27	90,7
MÉTHODE DE TER MEULEN		8,47	92,9

12. — Antipyrine.

N p. 100 calculé = 14,88.

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN cm ³		
0,2245	20,5	12,78	85,8
0,2294	20,8	12,69	85,2
TECHNIQUE DE LAURO		6,76	45,4
MÉTHODE DE TER MEULEN		14,55	97,7
		14,59	98,05

13. — Pyramidon.

N p. 100 calculé = 18,19.

TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE		N TROUVÉ P. 100 EN G.	RENDEMENT N P. 100
PRISE D'ESSAI EN G.	SO ⁴ H ² n/10 EN cm ³		
0,1356	15,80	16,31	89,66
0,1515	17,40	16,07	88,3
0,2013	23,10	16,06	88,2
TECHNIQUE DE FLEURY ET LEVAL- TIER		16,33	89,7
TECHNIQUE A L'ACIDE SÉLÉNIEUX		12,83	70,5
TECHNIQUE DE LAURO		11,49	63,1
MÉTHODE DE TER MEULEN		16,88	92,7

C. — CONCLUSIONS.

Des résultats précédents, obtenus en employant le mode de destruction sulfo-perchlorique, il ressort que :

I. Nous avons pu doser correctement l'azote, sans toutefois obtenir toujours le chiffre théorique, dans les corps ci-dessous :

Urée, acide hippurique, uréthane, diéthylmalonylurée, allylthiourée, anilarsinate de sodium, caséine, corps réputés facilement kjeldahlisables.

II. Nous avons obtenu des résultats irréguliers dans le cas de l'oxyéthylparaacétanilide et de l'hexaméthylènetétramine, corps également considérés comme peu résistants à la destruction sulfurique.

III. Nous n'avons dosé que 92 à 96 p. 100 de l'azote théorique de la méthylacétanilide, de l'acétanilide, du para-aminobenzoate de butyle normal, dans lesquels, cependant, l'azote est facilement dosé par les techniques dérivant de la méthode de KJELDAHL, ainsi que nous l'avons d'ailleurs vérifié.

IV. En ce qui concerne les corps pour lesquels le dosage de l'azote total est considéré comme impossible par la méthode de KJELDAHL, tels que l'antipyrine et le pyramidon, les chiffres d'azote trouvés, en employant la destruction sulfo-perchlorique, sont beaucoup plus élevés que ceux obtenus avec la méthode au sélénium, sans être cependant satisfaisants.

V. Pour l'oxyéthylparaacétanilide, le pyramidon, les chiffres trouvés sont d'autant plus éloignés du résultat théorique que les prises d'essai sont plus fortes, en utilisant dans tous les cas, la quantité d'acide perchlorique dilué strictement nécessaire pour obtenir la décoloration.

VI. La méthode de TER MEULEN nous a donné, dans tous les cas, des résultats satisfaisants, sauf en ce qui concerne

l'acide sulfanilique, le pyramidon et le chlorhydrate de bétaine dans lesquels nous n'avons dosé respectivement que 67,4 ; 92,7 ; 92,9 p. 100 de l'azote total.

VII. Les techniques au sélénium et à l'acide sélénieux, qui permettent une destruction particulièrement rapide, nous ont permis d'obtenir des résultats corrects en ce qui concerne les corps que nous avons considérés, sauf, toutefois, pour le chlorhydrate de bétaine, l'antipyrine et le pyramidon.

CHAPITRE II

Application du mode de destruction sulfo-perchlorique au dosage de l'azote dans les substances biologiques

A. — URINE.

Nous avons signalé plus haut que le perchlorate de potassium avait été employé par STCHERBAK [116], pour la détermination de l'azote total urinaire, de même que, plus tard, l'acide perchlorique par MEARS et HUSSEY [80], puis par YOE [134] et enfin par WIRBEL [131].

En ce qui nous concerne, les résultats satisfaisants obtenus pour l'urée nous ont conduit à essayer le mode de destruction sulfo-perchlorique, avec addition d'acide perchlorique dilué au 1/3, après début d'attaque sulfurique, pour la détermination de l'azote total urinaire.

Nous avons, à cet effet, employé la technique suivante : 5 cm³ d'urine sont placés dans une fiole Kjeldahl de 150 cm³, en verre Pyrex, avec 25 cm³ d'acide sulfurique d. 1,83 ; ce mélange est porté à l'ébullition pendant quelques minutes, puis, sans interrompre le chauffage, il est ajouté, goutte à goutte, de l'acide perchlorique dilué au 1/3, jusqu'à obtention d'un liquide incolore. L'ébullition est poursuivie environ 15 à 20 minutes.

Les chiffres d'azote ainsi trouvés ont été comparés à ceux fournis par la méthode de LAURO [65], utilisée déjà, dans le cas de l'urine, par TENNANT, HARREL et STULL [120]. PÉNAU et GAUDUCHON [93] ont comparé, à ce sujet, les procédés au sélénium et à l'acide sélénieux, aux techniques de DENIGÈS [22], de FLEURY et LEVALTIER [33] et de FOERSTER [34], laquelle, pour l'urine, fournit, d'après MESTREZAT [83], les chiffres les plus élevés. Voici, à ce sujet, un tableau donné par PÉNAU et GAUDUCHON (voir tableau VIII).

TABLEAU VIII
Azote par litre d'urine (en g.).

RÉFÉRENCES	TECHNIQUE DE FLEURY ET LEVALTIER	TECHNIQUE DE LAURO	TECHNIQUE A L'ACIDE SÉLÉNIEUX	TECHNIQUE DE DENIGÈS	TECHNIQUE DE FOERSTER
Urine A	5,74	5,77	5,75	5,73	5,77
— B	5,84	5,81	5,80	5,81	5,84
— C	6,51	6,52	6,54	6,53	6,55
— D	4,58	4,59	4,57	4,58	4,60
— E	8,16	8,15	8,15	8,15	8,17

Mais, en 1921, MESTREZAT, en collaboration avec Mlle JANET [84], puis seul, en 1926, a signalé qu'il existait, dans la plupart des urines, une fraction d'azote non dosable par les techniques par voie humide couramment employées.

Pour MESTREZAT, cet azote indosé est en quantité faible chez l'homme sain, voisin de 1 p. 100 de l'azote total urinaire chez des sujets atteints d'affections bénignes, mais peut atteindre 15 p. 100 de l'azote urinaire dans certaines

insuffisances hépatiques graves. Il est également important dans les affections du tube digestif et dans les cas de purgation. MESTREZAT a indiqué, de plus, que cet azote est dialysable. D'après BORVIN, ces écarts disparaissent à l'échelle microanalytique, ainsi que nous l'avons vu plus haut.

En 1932, SERIO et FIANDACA [107] ont trouvé, dans des urines de sujets normaux, des différences variant de 0,17 à 6,02 p. 100 et, chez des diabétiques, des écarts allant de 4,5 à 14,9 p. 100, qui diminuaient pendant la période de traitement par l'insuline.

D'autre part, en 1930, DI FRISCO [38] a signalé dans les urines de rats normaux des différences de 1,1 à 2 p. 100 et de 6 à 7 p. 100 sur les urines de rats morts d'inanition.

En 1933, PÉNAU et GAUDUCHON [93], sur des urines de femmes fortement anémiées, détenues à la prison de Saint-Lazare, sur lesquelles expérimentait DE STANKIEWICZ [115], dans le service du Docteur SÉE, ont indiqué un écart moyen de 4,6 p. 100.

Nous avons donc comparé les résultats obtenus, en employant le mode de destruction sulfo-perchlorique, à ceux de la méthode de DUMAS et de TER MEULEN.

En ce qui concerne la méthode de DUMAS, nous nous sommes adressée à la technique de WAHL et SISLEY [127], dont nous allons maintenant rappeler les caractères essentiels.

Cette technique a, sur le procédé classique, le grand avantage de diminuer considérablement la durée du dosage : en effet, avec un peu d'habitude, on peut parvenir à faire une combustion en 60 minutes. Les modifications apportées par les auteurs sont les suivantes :

1° Combustion d'un minimum de substance, de 80 à 100 mg.

2° Réduction des dimensions du tube de combustion lequel n'a, dans ce cas, que 60 cm., et 20 mm. de diamètre extérieur. Ce tube est en quartz opaque.

3° Modifications de la grille à combustion, permettant de chauffer au rouge la colonne d'oxyde de cuivre avant le début de la combustion de la substance, en évitant, malgré la faible longueur du tube, un échauffement, par conductibilité, de la nacelle. Cela a été obtenu par l'emploi d'une « grille cloisonnée » constituée par trois boîtes en terre réfractaire, d'inégale longueur, supportée par un cadre obtenu en assemblant des cornières de fer.

La première boîte qui est petite, correspond à la partie du tube renfermant le tortillon d'oxyde de cuivre ; la deuxième, de même taille, correspond à l'emplacement de la nacelle, elle est amovible grâce à une échancrure de ses plus petites parois, de la dimension du tube à combustion ; la troisième, beaucoup plus longue, contient la partie du tube enfermant la colonne d'oxyde de cuivre maintenue entre deux tortillons d'oxyde de cuivre, et le tortillon de cuivre réduit.

Le chauffage est assuré par une rampe de six becs ; quatre de ces becs sont placés sous la boîte la plus longue, chacun des deux autres, sous chacune des deux premières boîtes.

Le tube est relié, du côté de la substance, à un générateur de CO^2 constitué par un gros tube à essai en Pyrex contenant du bicarbonate de sodium. L'autre extrémité du tube de combustion est reliée par un tube muni d'un robinet à deux voies, soit à une trompe à vide, soit à l'azotomètre.

Une petite quantité d'urine (0 g., 200 — 0 g., 300) était pesée dans une ampoule que l'on fermait et que l'on introduisait dans le tube à combustion, la pointe préalablement ouverte en avant, et l'opération était poursuivie suivant la manière habituelle.

Pour la méthode de TER MEULEN, la prise de 0 cm³ 50, était versée sur 1 g., 50 de carbonate de baryum placé dans la nacelle. Le dosage était effectué comme il a été indiqué plus haut.

En ce qui concerne la technique au sélénium, la proportion des réactifs employés a été la suivante :

Urine 5 cm³.
 Sélénium 0 g., 1
 Sulfate de potassium 4 g.
 Acide sulfurique pur, d. 1,83. 10 cm³

Voici des résultats obtenus sur des urines de sujets sains (voir tableau IX).

TABLEAU IX.

Azote total obtenu en g. p. 1.000 cm³ d'urine.

RÉFÉRENCES	MÉTHODE DE DUMAS	MÉTHODE DE TER MEULEN	TECHNIQUE DE LAURO	TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE
Urine n° 1	15,22	15,24	15,16	15,16
— n° 2	11,95	11,98	11,65	11,62
— n° 3		14,95	14,82	14,80
— n° 4		11,60	11,41	11,30

Le mode de destruction sulfo-perchlorique, appliqué à l'urine, nous a conduit à des chiffres d'azote tout à fait identiques à ceux de la technique au sélénium. Mais, ces résultats, que nous avons obtenus en partant d'urine de sujets sains, sont légèrement inférieurs à ceux de la méthode de DUMAS, ainsi qu'il était possible de le prévoir d'après ce que nous avons rappelé plus haut. Les chiffres donnés par la méthode de TER MEULEN sont pratiquement identiques à ceux de la méthode de DUMAS.

B. — MATIERES ALIMENTAIRES.

Nous avons également dosé l'azote, après destruction sulfo-perchlorique, dans des poudres alimentaires obtenues suivant la technique indiquée par PÉNAU et GAUDUCHON [93], que nous rappelons brièvement : dessiccation sous vide phosphorique à 35°, puis délipidation au toluène et pulvérisation au mortier.

Voici, dans le cas de l'emploi de la destruction sulfo-perchlorique, les proportions des différents réactifs mis en œuvre :

Substance à détruire 0 g., 8
 Acide sulfurique pur, d. 1,83 25 cm³
 Acide perchlorique dilué au 1/3, q. s. pour décolorer.

Voici quelques résultats obtenus (voir tableau X).

TABLEAU X.

Azote p. 100 g. de substance sèche (en g.).

RÉFÉRENCES	MÉTHODE DE DUMAS	MÉTHODE DE TER MEULEN	TECHNIQUE AU SÉLÉNIUM	TECHNIQUE A L'ACIDE SÉLÉNIEUX	TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE
Alim. A 11	3,45	3,52	2,89	2,91	2,88
— A 20	3,54	3,61	3,52		3,54
— A 23	2,95	2,98	2,95	2,93	2,95
— A 27	3,44	2,97	2,91	2,91	2,91

Les mélanges A 11 et A 27 renferment les aliments usuels de l'homme (viandes, pain, café, vin, etc.). Les mélanges A 20 et A 23 ne renferment pas d'aliment carné.

Dans A 20, 13 p. 100, dans A 23, 25 p. 100 de l'azote de la ration sont fournis sous forme de levure de bière.

Il nous semble intéressant de signaler que les écarts entre les procédés par voie humide et la méthode de DUMAS qui s'élèvent à 15,5 à 16,6 p. 100 dans le cas de l'alimentation normale, n'existent plus dans le cas d'une alimentation riche en levure de bière et, cependant, THORNE [123] a signalé que les écarts entre le procédé de KJELDAHL-GÜNNING et la méthode de DUMAS peuvent, pour la levure, atteindre 10 p. 100.

Ces faits sont à rapprocher des observations de PÉNAU et GAUDUCHON relatives à ces mêmes mélanges pour lesquels il a, de plus, été montré par ces mêmes auteurs que la technique de LAURO donnait d'aussi bons résultats que la technique de FLEURY et LEVALTIER et aussi des indications données par DI FRISCO [38], LEMOIGNE, DÉSVEAUX et MONGUILLON [68] et par ANNE [3].

DI FRISCO, en 1930, opérant sur des pulpes musculaires de rats, trouve entre les méthodes de DUMAS et de KJELDAHL des écarts de 2 p. 100 chez le rat normal, et de 8 à 12 p. 100 chez les rats soumis à l'inanition.

D'après LEMOIGNE, DÉSVEAUX et MONGUILLON, il peut exister, dans le cas de farines, des écarts allant de 1,9 (farine de Lupin) à 16,2 p. 100 (farine de Blé).

Ces faits ont été confirmés par ANNE qui a cité, notamment, pour une farine de Blé, une différence de 9 p. 100 entre les techniques par voie humide et la méthode de DUMAS.

On a pu se demander si les glucides pouvaient avoir, dans le cas des farines, une influence sur les résultats de la méthode de KJELDAHL : PÉNAU et GAUDUCHON ont montré que l'on obtenait des résultats semblables en dosant l'azote dans un échantillon de Gluten et dans le même Gluten additionné de quantités variables de glucose ou d'amidon.

Pour ANNE, ni l'amidon, ni la matière grasse, n'ont d'influence sur le dosage de l'azote dans le Gluten.

Quoi qu'il en soit, pour les matières alimentaires, de même que pour l'urine, les chiffres trouvés pour l'azote

total, en employant la destruction sulfo-perchlorique, sont pratiquement identiques à ceux des autres techniques par voie humide.

C. — LAIT.

Nous avons déterminé quantitativement l'azote dans différents échantillons de lait, en partant d'une prise d'essai de 5 cm³ et en employant les mêmes proportions de réactifs que celles indiquées ci-dessus à propos des matières alimentaires.

Les résultats, ainsi obtenus, consignés dans le tableau XI, montrent que les chiffres donnés par la technique sulfo-perchlorique sont très voisins de ceux fournis par la technique de LAURO et par la technique à l'acide sélénieux.

TABLEAU XI.

Azote pour 1.000 cm³ de lait (en g.).

RÉFÉRENCES	MÉTHODE DE DUMAS	TECHNIQUE A L'ACIDE PERCHLORIQUE	TECHNIQUE SULFO-PERCHLORIQUE	TECHNIQUE DE LAURO
Lait n° 1	5,51	5,30	5,24	
Lait n° 2		5,01	4,98	
Lait n° 3			5,64	5,64
Lait n° 4			4,81	4,85

CHAPITRE III

Application du mode de destruction sulfo-perchlorique à la recherche qualitative de l'azote

Etant données la rapidité et la commodité de la destruction sulfo-perchlorique, nous avons pensé qu'elle pourrait, bien que ne donnant pas toujours une précision suffisante en ce qui concerne le dosage de l'azote, être, néanmoins, employée avec succès pour la détermination qualitative de l'azote dans les substances organiques. Nous avons alors entrepris différents essais pour établir une technique qui soit d'un emploi facile.

Nos essais préliminaires ont porté sur le pyramidon, dans lequel nous avons essayé de mettre l'azote en évidence en utilisant la destruction sulfo-perchlorique. Chacun de nos essais a été fait sur 0 g., 01 de substance, soit 0 cm³ 2 d'une solution aqueuse de pyramidon à 5 p. 100.

Nous avons employé :

1° L'acide perchlorique à 66 p. 100, dilué au 1/3, ajouté goutte à goutte au mélange acide sulfurique + pyramidon, à l'ébullition jusqu'à obtention de la décoloration.

2° La quantité d'acide perchlorique à 66 p. 100 dilué au 1/3, nécessaire pour l'obtention de la décoloration ajoutée, à froid, au mélange acide sulfurique + pyramidon.

3° Le mélange SO^4H^2 + acide perchlorique à 66 p. 100, renfermant les proportions variables suivantes des deux acides :

0 cm ³ 75 SO^4H^2 conc.	+	0 cm ³ 25 ClO^4H	à 66 p. 100
0 cm ³ 50 —	—	+	0 cm ³ 50 — —
0 cm ³ 25 —	—	+	0 cm ³ 75 — —

4° L'acide perchlorique à 66 p. 100 seul, ajouté à 0 cm³ 2 de la solution aqueuse de pyramidon à 5 p. 100 et en portant à l'ébullition.

Tous ces essais ont été pratiqués dans des matras en verre Pyrex de 25 cm³. Après décoloration, refroidissement du liquide de destruction, addition de quelques cm³ d'eau bidistillée puis d'un excès de soude et chauffage, l'ammoniaque a été décelée :

1° Au moyen du papier de tournesol.

2° Au réactif de NESSLER.

3° A l'odeur.

Le temps nécessaire pour obtenir la décoloration a été noté pour chaque essai.

La destruction la plus rapide a été obtenue, ainsi que le montre le tableau ci-joint (tableau XII), en ajoutant l'acide perchlorique dilué à l'acide sulfurique à chaud.

Dans les essais n° 3, 4, 5, 6, où il a été employé un excès d'acide perchlorique, le liquide final est toujours plus ou moins coloré en jaune.

TABLEAU XII.

ESSAI	SO ⁴ H ² d. 1,83 EN CM ³	ClO ⁴ H A 66 p. 100 DILUÉ AU 1/3 NOMBRE DE GOUTTES	ClO ⁴ H A 66 p. 100 EN CM ³	DÉCOLORA- TION AU BOUT DE
n° 1	1	III à chaud		1 m. 55 s.
n° 2	1	III à froid		2 m.
n° 3	0,75		0,25	2 m. 20 s.
n° 4	0,50		0,50	2 m. 20 s.
n° 5	0,25		0,75	2 m. 20 s.
n° 6	0		1	2 m. 20 s.

Nous avons également pratiqué, par les moyens indiqués ci-dessus, la recherche qualitative de l'azote dans le mélange :

Pyramidon : 0 g., 01 (0 cm³ 2 de solution aqueuse de pyramidon à 5 p. 100).

Glucose : 0 g., 02 (0 cm³ 1 de solution de glucose à 20 p. 100).

La destruction a été, comme dans le cas du pyramidon seul, obtenue le plus rapidement, en ajoutant l'acide perchlorique dilué à l'acide sulfurique à chaud (voir tabl. XIII).

Ajoutons que, dans le cas de l'emploi de l'acide perchlorique dilué, la recherche de l'azote peut être pratiquée en 4 minutes.

Nous avons appliqué à de nombreux corps la technique ci-dessous.

TABLEAU XIII.

ESSAI	SO ³ H ² d. 1,83 EN cm ³	ClO ⁴ H A 66 p. 100 DILUÉ AU 1/3 NOMBRE DE GOUTTES	ClO ⁴ H A 66 p. 100 EN cm ³	TEMPS NÉCESSAIRE A LA DÉCOLORA- TION
n° 1	1	VI à chaud		2 m. 5 s.
n° 2	1	VI à froid		2 m. 10 s.
n° 3	0,75		0,25	2 m. 30 s.
n° 4	0,50		0,50	2 m. 30 s.
n° 5	0,25		0,75	2 m. 30 s.
n° 6			1	2 m. 30 s.

Une petite quantité du corps susceptible de renfermer de l'azote est additionnée de 1 cm³ d'acide sulfurique pur, de densité 1,83, dans un tube à essai en Pyrex de 200 mm × 20 mm., ou mieux, dans un matras de KJELDAHL en Pyrex de 25 cm³. On porte à l'ébullition, puis on ajoute, goutte à goutte, de l'acide perchlorique à 66 p. 100, dilué au 1/3 en volume, jusqu'à décoloration. A ce moment, on interrompt le chauffage et l'on refroidit sous un courant d'eau. On additionne le liquide de destruction refroidi de quelques cm³ d'eau bidistillée puis d'un excès de soude et on chauffe, en plaçant à l'orifice du tube un papier imbibé de réactif de NESSLER ou un papier de tournesol.

Nous avons ainsi pu mettre l'azote en évidence dans les substances ci-dessous : acétanilide, acide cyanurique, acide picrique, acide sulfanilique, acide urique, allylthiourée, aniline, antipyrine, benzidine, bleu de méthylène, caféine, chlorhydrate basique de quinine, chlorhydrate de bétaine, chlorhydrate d'hydroxylamine, chlorhydrate d'orthophé-

nylène-diamine, chlorhydrate de semi-carbazide, cyanure de mercure, diéthylmalonylurée, dipénylamine, éthylphénylmalonylurée, gélatine, hexaméthylènetétramine, méthylacétanilide, naphtylamines, nitrate de pilocarpine, nitrobenzène, oxéthylparaacétanilide, paraaminobenzoate de butyle normal, paradiméthylaminobenzaldéhyde, peptone, phénylhydrazine, phénylsemicarbazide, protéinate d'argent, pyramidon, sulfate d'hydrazine, urée, uréthane, vitellinate d'argent.

CONCLUSIONS

I. Nous avons, dans la première partie de notre travail, pu constater, en passant en revue les principales modifications apportées à la méthode de KJELDAHL, depuis 1924, que, parmi les adjuvants les plus employés depuis cette époque, se trouvaient le sélénium, l'eau oxygénée et l'acide perchlorique. Malheureusement, l'emploi de ces différents corps n'a pas permis d'obtenir des chiffres d'azote corrects avec les molécules considérées jusqu'ici comme difficilement kjeldahlisables, ou nécessitant une réduction préalable. Mais, ces adjuvants peuvent rendre de grands services dans les applications courantes de la méthode de KJELDAHL, si l'on a bien soin de rester dans des conditions comparables et de ne jamais perdre de vue que les résultats obtenus par destruction sulfurique sont, dans certains cas, très inférieurs à ceux de la méthode étalon : la méthode de DUMAS.

II. L'emploi de l'acide perchlorique, en quantité strictement nécessaire et suffisante, ce qui peut être réalisé, ainsi que nous l'avons proposé, en ajoutant goutte à goutte de l'acide perchlorique à 66 p. 100 dilué au tiers, au liquide de destruction, ne nous a pas permis d'obtenir des chiffres d'azote exacts avec toutes les substances chimiquement définies, réputées justiciables de la méthode de KJELDAHL, que nous avons considérées, malgré les résultats encourageants obtenus pour certaines d'entre elles.

En revanche, l'utilisation du mode de destruction sulfo-perchlorique, dans les conditions rappelées ci-dessus, nous a conduit à des résultats pratiquement identiques à ceux

des autres modifications de la méthode de KJELDAHL, pour la détermination de l'azote dans certaines substances biologiques (urine, matières alimentaires, lait).

III. La méthode de TER MEULEN utilisée dans le cas de corps chimiquement définis, nous a donné, sauf pour le chlorhydrate de bétaine, le pyramidon et l'acide sulfanique, d'excellents résultats et, notamment, pour la détermination de l'azote dans un échantillon d'antipyrine. Dans le cas de substances biologiques, elle nous a conduit, dans la plupart des cas, à des résultats très voisins de ceux donnés par la méthode de DUMAS, considérée depuis longtemps, à juste titre, comme la plus exacte.

IV. La technique de WAHL et SISLEY permet d'effectuer rapidement des dosages par la méthode de DUMAS. C'est pourquoi l'emploi de cette technique présente un grand intérêt dans tous les cas où la méthode de KJELDAHL se trouve en défaut.

V. Enfin, l'action énergique de l'acide perchlorique qui peut rendre de grands services pour la minéralisation rapide de grandes quantités de matière organique, en vue du dosage des différents éléments (soufre, phosphore, silice, chrome, titane, or, sodium, potassium, arsenic, etc.) peut être employée, non seulement pour la détermination quantitative de l'azote dans les substances biologiques, mais aussi, grâce à sa rapidité, à la recherche qualitative de cet élément.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse,
Reté FABRE

Vu :
Le Doyen de la Faculté,
Paul GUÉRIN

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLEN (W.-F.). — Accurate and adaptable method micro-Kjeldahl of Nitrogen determination. (*Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1931, **3**, 239-240.)
2. ANDERSEN (A.-C.) et NORMAN JENSEN (B.). — Zur Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl. (*Ztschr. für. anal. Chem.*, 1926, **67**, 427-448.)
3. ANNE (P.). — Comparaison de la méthode de Kjeldahl à celle de Dumas pour quelques produits agricoles. (*Ann. Fals. Fraudes*, 1934, **27**, 220-222.)
4. BAL (D.-V.). — The determination of Nitrogen in heavy clay soils. (*Jour. Agr. Sci.*, 1925, **15**, 454-459.)
5. BEET (A.-E.). — The estimation of Nitrogen in coal using Selenium as a catalyst. (*Chem. Abst.*, 1932, 6098, d'après *Fuel*, 1932, **11**, 196-199.)
6. BELOW (N.) et PAKHAMOVA (O.). — Emploi du sélénium comme catalyseur dans le dosage de l'azote par la méthode Kjeldahl. (*Chimie et Industrie*, 1934, **1**, 300-184p, d'après *Kojevenco-Obouvn Prom.*, 1933, **12**, 371-372.)
7. BERMAN (V.) et LAUFER (L.). — Nitrogen determination by the micro-Kjeldahl method in malt analysis. (*Chem. Abst.*, 1925, 1927, d'après *Woschschr. Brauer.*, 1924, **41**, 221.)

8. BOIVIN (A.). — Le microdosage du carbone par oxydation sulfo-chromique et le microdosage de l'azote par destruction sulfurique. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, 1269-1409.)
9. BOIVIN (A.) et ROCHE (J.). — Le microdosage du carbone et de l'azote dans les matières fécales. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, 543-548.)
10. BOUYER (J.). — Dosage des succédanés des farines. (*Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1927, **65**, 59-66.)
11. BROWN (B.-E.). — Determination of Carbon and Nitrogen on the same soils sample. (*Ind. Eng. Chem.*, 1927, **19**, 629-630.)
12. CARPIAUX (E.). — Sur une cause d'erreur dans la méthode de Kjeldahl-Gunning. (*Bull. Soc. Chim. Belge*, 1913, **27**, 13).
13. CASE (A.-E.) et PRICE (W.-J.). — Resume of experiments on the estimation of Nitrogen in yeast. (*Chem. Abst.*, 1933, 2249, d'après *J. Inst. Brewing*, 1933, **39**, 35-36.)
14. CHILES (H.-M.). — Direct nesslerization of Kjeldahl digestions. (*Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1928, **50**, 217-221.)
15. CHRISTENSEN (L.-M.) et FULMER (E.-I.). — A modified Kjeldahl method for the determination of Nitrogen content of yeast. (*Chem. Abst.*, 1929, 407, d'après *Plant. Physiol.*, 1927, **2**, 455-460.)
16. CLIQUET (R.), GUILBERT (J.) et PÉNAU (H.). — Préparation industrielle d'eau bidistillée pour usages biologiques. Caractéristiques physico-chimiques. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, **15**, 1044-1069.)
17. CROSSLEY (H.-E.). — The application of Selenium as a catalyst to the Kjeldahl method for the determination of Nitrogen in coal and coke. (*Journ. Soc. Chem. Ind.*, 1932, **51**, 237T-238T.)
18. VAN DAM (W.). — Contribution à notre connaissance du dosage de l'azote dans les amines et leurs combinaisons chlorométalliques. (*Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1895, **14**, 217-226.)

19. DAVIS (C.-F.) et WISE (M.). — Report of the Subcommittee on Selenium as a Kjeldahl Catalyst in the Cereal Laboratory. (*Chem. Abst.*, 1934, 2190, d'après *Cereal Chem.*, 1931, **8**, 349-360.)
20. DEB (S.-K.). — Estimation of nitrate-nitrogen by a modification of Kjeldahl method. (*Ind. Chem.*, 1925, **1**, 452-453.)
21. DELÉPINE (M.). — Décomposition du sulfate d'ammonium par l'acide sulfurique à chaud, en présence de platine. (*Bull. Soc. Chem.*, 1906, **35**, 8-10.)
22. DENIGÈS (G.). — Détermination rapide de l'azote total dans les matières organiques et les liquides de l'économie. (*Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1894, **34**, 362-372.)
23. DONEEN (L.-D.). — A micro-method for Nitrogen in plant material. (*Chem. Abst.*, 1933, 1023, d'après *Plant. Physiol.*, 1932, **7**, 717-720.)
24. DONOVAN (W.). — The estimation of Nitrogen in coal. (*The Analyst*, 1924, **49**, 57-62.)
25. DORFMULLER (G.). — Le dosage de l'azote dans les osazones, d'après la méthode de Kjeldahl. (*Chim. et Ind.*, 1930, **2**, 1206-830b, d'après *Ztschr. Ver Deutsch. Zucker Ind.*, 1930, **80**, 407-412.)
26. DUPRAY (M.). — A Modified digestion acid for non protein Nitrogen determination. (*Journ. Lab. Clin. Méd.*, 1927, **12**, 387.)
27. EDWARDS (W.). — Determination of Nitrogen in industrial products. (*Ind. Chem.*, 1925, **1**, 122-123.)
28. ELEK (A.) et SOBOTKA (H.). — The Kjeldahl-Pregl method applied to nitro compounds. (*Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1926, **48**, 501-503.)
29. EMMERT (E.-M.). — The chlorate method for the determination of nitrate Nitrogen, total Nitrogen and other elements in soils and plant tissues. (*Journ. Ass. off. Agr. Chem.*, 1929, **12**, 240-247.)
30. FISZERMAN (J.-H.) et FISZERMAN-GARBER (Mme D.). — Destruction de la matière organique en vue de la recherche et du dosage des matières minérales dans les poudres de foie et de rein. (*Bull. Se. Pharmacol.*, 1933, **40**, 157-166.)

31. FISZERMANN (J.-H.) et FISZERMANN-GARBER (Mme D.). — Dosage de l'azote sous ses différentes formes dans la poudre de rein et de foie. (*Bull. Sc. Pharmacol.*, 1933, **40**, 210-213.)
32. FLAMAND (Cl.) et PRAGER (B.). — Analyse von Verbindungen mit Stickstoff-Stickstoff-Bindung nach der Kjeldahl Method. (*Ber. der chem. Ges.*, 1905, **38**, 559-560.)
33. FLEURY (P.) et LEVALTIER (H.). — Recherches sur le dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl et ses modifications. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1924, **29**, 137-147 ; 1924, **30**, 265-272.)
34. FOERSTER (O.). — Zur Bestimmung des Salpetersaure Stickstoffs nach der Kjeldahl'schen Methode. (*Ztschr. für anal. Chem.*, 1889, **28**, 422-427.)
35. FOIT (R.). — Eine einfache Methode zur raschen und verlässlichen Bestimmung des Stickstoffs im Harne und Blute. (*Biochem. Ztschr.*, 1926, **169**, 161-168.)
36. FREY (R.-W.), JENKINS (L.) et JOSLIN (A.-M.). — Comparison of several methods of hydrolysis in determining Nitrogen in leather. (*Chem. Abst.*, 1928, 3550, d'après *Jour. Amer. Leather Ass.*, 1928, **23**, 397-402.)
37. FRIEDRICH (A.). — Über die generelle Anwendung der Mikro-Kjeldahl bestimmung. (*Ztschr. für. physiol. Chem.*, 1933, **216**, 68-76.)
38. DI FRISCO (A.). — Recherches sur les constituants cellulaires isolés des cellules et les tissus. VI Déterminations comparatives par les méthodes de Kjeldhal et de Dumas de l'azote total des tissus et des liquides organiques dans différentes conditions expérimentales. (*Arch. intern. Physiol.*, 1930, **33**, 137-141.)
39. FUCHS (H.-J.) et FALKENHAUSEN (M.-V.). — Eine neue Mikro-Stickstoffbestimmungsmethode und ihre Anwendung bei der « Ca R » (Krebsreaktion). (*Biochem. Ztschr.*, 1932, **245**, 304-313.)
40. GOLUB (W.). — Anwendung der colorimetrischen Methode zur Stickstoffbestimmung in Genussmitteln und anderen Stoffen. (*Ztschr. für anal. Chem.*, 1927, **70**, 119-128.)

41. GRANT (J.). — Determination of nitrogen contents for technical purposes. (*Chem. Abst.*, 1934, 5364, d'après *Chem. Age*, 1934, **30**, 531.)
42. GUILLAUME (A.). — Application de la méthode de Kjeldahl modifiée au dosage de l'azote dans quelques alcaloïdes. (*Bull. Sc. Pharmacol.*, 1927, **34**, 213-220.)
43. GUILLEMET (R.) et SCHELL (C.). — Technique rapide de dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl en vue de la détermination des protéines totales dans les blés, farines et issues de meuneries. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 1631-1636.)
44. GUNNING (J.-W.). — Ueber eine Modification der Kjeldahl-methode. (*Ztschr. für anal. Chem.* 1889, **28**, 188-191.)
45. HARTLEY (O.). — Dilution method for micro-Kjeldahl determinations. (*Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1934, **6**, 249.)
46. HITCHCOCK (D.-I.) et BELDEN (R.-C.). — An accurate semimicro-Kjeldahl method. (*Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1933, **5**, 402.)
47. HOPPE-SEYLER. — (*Handb. der Biochemie*, 8^e édit., 560.)
48. ILLARIONOW (W.-W.) et SSOLOWJEVA (N.-A.). — Mechanismus der Katalyse mittels der Schwefelanaloga (Se und Te) bei Stickstoffbestimmungen durch Verbrennung mit Schwefelsäure. (*Ztschr. für anal. Chem.*, 1935, **100**, 328-343.)
49. ISELIN (E.). — Marche à suivre dans le microdosage de l'azote, en particulier dans les produits alimentaires. (*Chim. et Ind.*, 1934, **2**, 180, 140b, d'après *Mitt. Lebensmitt. Hyg.*, 1933, **24**, 263-273.)
50. IWATZURU (R.). — Zur Mikrobestimmung des Blutrestickstoffs mittels Natriumhypobromit. (*Biochem. Ztschr.*, 1928, **195**, 442-448.)
51. JENDRASSIK (L.) et CLEGHORN (R.-A.). — Simple method for the determination of non protein Nitrogen. (*Chem. Abst.* 1934, 4088, d'après *Klin Wochschr.*, 1934, **13**, 450.)

52. JOHNSON (C.-M.). — Determination of soluble and insoluble Nitrogen, in ferrochromium, corrosion and heat resisting steels. (*Chem. Abst.*, 1934, 6083, d'après *Iron Age*, 1934, **134**, 10-14.)
53. JOLDBAUER. — Die Bestimmung des Stickstoffes in Nitraten nach der Kjeldahl'schen Method. (*Chem. Zentr.*, 1886, **17**, 433-434.)
54. JUSTIN-MUELLER (Ed.). — Etude sur le dosage de l'azote total dans les urines et particulièrement en présence du sucre. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1915, **11**, 171-174.)
55. KEER (R.-H.). — Report on the analysis of meat and meat products. (*Chem. Abst.*, 1928, 125, d'après *Journ. Assoc. off. Agr. Chem.*, 1927, **10**, 498-500.)
56. KITTO (W.-H.). — Rapid determination of Nitrogen by the Kjeldahl-Nessler process. (*The Analyst*, 1934, **59**, 733-735.)
57. KJELDAHL (G.). — Neue methode zur Bestimmung des Stickstoffes in organischen Korpen. (*Ztschr. für anal. Chem.*, 1883, **22**, 366.)
58. KOCH (F.-C.) et MAC MEEKIN (T.-L.). — A new direct nesslerization Microkjeldahl method and a modification of the Nessler-Folin reagent for ammonia. (*Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1924, **46**, 2066-2069.)
59. KRÜGER (M.). — Ueber die Bestimmung des Stickstoffes in Benzol-, Pyridin-, und Chinolin-derivaten nach der Kjeldahl'schen Methode. (*Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 1894, **27**, 609.)
60. KRÜGER (M.). — Ueber die Bestimmung des Stickstoffes in Nitraten, Nitro-und Nitrosoverbindungen auf nassem Wege. (*Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 1894, **28**, et svl.)
61. KULTJUGIN (A.) et GUBAREFF (E.). — Die schnellste Mikromethode der Stickstoffbestimmung. (*Biochem. Ztschr.*, 1925, **164**, 437-441.)
62. KÜRSCHNER (K.). — Ist die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl bei organischen Körpern allgemein anwendbar ? (*Ztschr. für anal. Chem.*, 1926, **68**, 209-216.)
63. KÜRSCHNER (K.) et SCHARER (K.). — Über Verwendung von Kupferpulver in der analytischen Chemie. (*Ztschr. für anal. Chem.*, 1926, **68**, 1-14.)

64. KURTZ (F.-E.). — Selenium in the determination of Phosphorus and Nitrogen in phospholipides. (*Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1933, **5**, 260-267.)
65. LAURO (M.-F.). — Use of Selenium catalyst in the determination of Nitrogen by the Kjeldahl method. (*Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1931, **3**, 401-402.)
66. LEBEDIANTZEW. — Determination of the nitrogen contained in vegetable matter according to Gunning-Atterberg method. (*Chem. Abst.*, 1915, 2494, d'après *Russ. I. Exp. Landw.*, 1915, **16**, 95.)
67. LEMATTE (L.), BOINOT (G.) et KAHANE (E.). — Dosage des minéraux contenus dans les principaux organes utilisés en opothérapie. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1927, 8^e sér., **5**, 325-331 et 361-373.)
68. LEMOIGNE (M.), DÉSVEAUX (R.) et MONGUILLON (P.). — Note sur la valeur de la méthode de Kjeldahl. (*Ann. Fals. Fraudes*, 1934, **27**, 216-219.)
69. LEPPER (W.). — Rasches Aufschliessen des Kalkstickstoffs. (*Ztschr. für analyt. Chem.*, 1930, **30**, 331-334.)
70. LEVALTIER (H.). — Recherches sur le dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. (*Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1924.)
71. LUCAS (R.) et HIRSCHBERGER (W.). — Über eine Methode zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs in Harnstoff-Nitrat-Gemischen. (*Ztschr für angew. Chem.*, 1929, **42**, 99-100.)
72. LUNDIN (H.) et ELLBURG (J.). — Détermination rapide de l'azote d'après le procédé Kjeldahl. (*Ann. Chim. Anal.*, 1930, **12**, 2^e série, 15, d'après *Wochenschr. Brauerei*, 1929, **46**, n^{os} 14-15, 133-137 et 147-149.)
73. MACH (F.) et LEPPER (W.). — The use of copper sulfate instead of Mercury in the Kjeldahl digestion. (*Chem. Abstr.*, 1930, 2208, d'après *Landw. Vers.-Sta.*, 1929, **109**, 363-366.)
74. MARGOSCHES (B.-M.), KRISTEN (W.) et SCHEINOST (E.). — Über den Einfluss der Art und Ortsstellung der Substituenten auf die Kjeldahlisation aromatischer Nitroverbindungen. (*Ber. chem. Ges.*, 1923, **56**, 1943-1950.)

75. MARGOSCHES (B.-M.) et SCHEINOST (E.). — Ersatz des einwertigen Phenols durch mehrwertige Phenole bei der Kjeldahlisation von Nitraten. (*Ber. chem. Ges.*, 1925, **58**, 1857-1860.)
76. MARGOSCHES (B.-M.) et SCHEINOST (E.). — Über ein bemerkenswertes Verhalten der Alkalisulfate bei der Kjeldahlisation der Nitraniline. (*Ber. chem. Ges.*, 1925, **58**, 2233-2237.)
77. MARGOSCHES (B.-M.), SCHEINOST (E.) et WOYNAR (V.). — Über die quantitative Kjeldahlisation des Nitrats mit Phenol-schwefelsäure und der Kaliumsulfat. (*Ber. chem. Ges.*, 1925, **58**, 1850-1857.)
78. MARGOSCHES (B.-M.) et VOGEL (E.). — Studien über die Kjeldahlisation der Mononitrophenole, Mononitrobenzoesäuren und der Mononitrozimtsäuren. (*Ber. chem. Ges.*, 1922, **55**, 1380-1389.)
79. MARGOSCHES (B.-M.) et VOGEL (E.). — Über den Einfluss der Ortsstellung des Substituenten bei der Kjeldahlisation von aromatischen Nitroverbindungen. (*Ber. chem. Ges.*, 1919, **52**, 1992-1998.)
80. MEARS (B.) et HUSSEY (R.). — The Use of Perchloric acid as an aid to digestion in the Kjeldahl Nitrogen determination. (*Ind. Eng. Chem.*, 1921, **13**, 1054-1056.)
81. MESMANN (H.-C.). — Metallic selenium as catalyst in Kjeldahl digestions. (*Cereal Chemistry*, 1932, **9**, 357.)
82. MESTREZAT (W.). — Notes de laboratoire sur l'emploi de quelques indicateurs colorés. L'alizarine sulfonate de sodium sensibilisée. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1920, **21**, 185-192.)
83. MESTREZAT (W.). — L'azote urinaire titrable par la méthode de Kjeldahl. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, 341-351.)
84. MESTREZAT (W.) et JANET (Mlle M.-P.). — Présence dans l'urine d'un reste azoté que ne dose pas la méthode de Kjeldahl. Etude comparée des résultats fournis, dans quelques cas, par la technique de Kjeldahl-Foerster et la méthode de Dumas. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1921, **3**, 88-94.)

85. MESTREZAT (W.) et JANET (Mlle M.-P.). — L'azote titrable par la méthode de Kjeldahl. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1921, **3**, 105-130.)
86. MIETHKE (N.) et FINZENHAGEN (H.). — Les microméthodes dans l'analyse du lait. Le micro-dosage de l'azote total, de la caséine et de l'albumine du lait. (*Chimie et Industrie*, 1933, **1**, d'après *Milchwirtsch Forsch*, 1932, **14**, 187-194.)
87. MILBAUER. — Ueber die quantitative Bestimmung des Stickstoffs in Hydrazonen und Osazonen nach Kjeldahl. (*Ztschr. für anal. Chem.*, 1903, **42**, 725-732.)
88. MOREIGNE (H.). — Dosage de l'azote total urinaire. (Paris, 1896.)
89. MYERS (V.-C.). — The use of hydrogen peroxide in the micro-Kjeldahl nitrogen method. (*Journ. Lab. Clin. Med.*, 1931, **17**, 272-273.)
90. OLSEN (C.). — On the determination of Nitrogen in soils. With special reference to the presence of nitrates and nitrites. (*C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 1927, **17**, n° 3)
91. OSBORN (R.-A.) et KRASNITZ (A.). — A study of the Kjeldahl method. II Comparaison of Selenium with Mercury and with Copper catalysts. (*Journ. Ass. off. Agr. Chem.*, 1933, **16**, 110-113.)
92. PARKER (J.-G.) et TERRELL (J.-T.). — Use of perchloric acid for Kjeldahl digestions in the determination of Nitrogen in leather. (*Chem. Abstr.*, 1922, 1163, d'après *Journ. Soc. Leather Trades' Chem.*, 1921, **5**, 380-384.)
93. PÉNAU (H.) et GAUDUCHON (J.). — Contribution à l'étude chimique du bilan d'azote. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, **15**, 1483-1497.)
94. PITTARELLI (E.). — Sull'uso dell'acqua ossigenata e dell'acido persolforico, nella determinazione dell'azoto secondo Kjeldahl. (*Bioch terap. sper.*, 1927, **14**, 308-310.)
95. POTH (E.-J.), ARMSTRONG (W.D.), COGBURN (C.-C.) et BAILEY (J.-B.). — The estimation of Nitrogen petroleum and bitumeus. (*Ind. Eng. Chem.*, 1928, **20**, 83-85.)

96. PRINCE (A.-L.). — Report on the determination of Nitrogen in fertilizers. (*Chem. Abst.*, 1931, 4961, d'après *Journ. Assoc. off. Agr. Chem.*, 1934, **17**, 246-250.)
97. PROVEDI (F.). — Reaction accelerators in the determination of organic Nitrogen by Kjeldahl method. (*Chem. Abst.*, 1929, 357, d'après *Atti. accad. fisiocrit. Siena*, 1928, **3**, 433-435.)
98. RANKER (R.). — Cité par Sisley et David. (*Journ. Assoc. off. Agr. Chem.*, 1927, **16**, 230-251.)
99. RICH (C.-E.). — A note of the use of selenium oxychloride as a catalyst in the determination of Nitrogen by the Kjeldahl method. (*Cereal. Chem.*, 1932, **9**, 118-120.)
100. ROSE (A.-R.). — A micro method for determining Nitrogen. (*Journ. of Biol. Chem.*, 1925, **64**, 253-256.)
101. SACCARDI (P.). — Sull'impiego del Perhydrol nella determinazione dell'azoto secondo Kjeldahl. (*Bioch. terap. sper*, 1927, **14**, 252-255.)
102. SANDSTEDT (R.-M.). — A note on the use of Selenium as a catalyst in the Kjeldahl digestion with natural gas heat. (*Cereal. Chem.*, 1932, **9**, 156-157.)
103. SAZAVSKY (V.). — The microchemical determination of Nitrogen by Kjeldahl's method. (*Chem. Abst.*, 1927, **30**, d'après *Listy Cukrovar*, 1924-5, **43**, 151 ff.)
104. SBOROWSKY (M. et I.). — Sur un nouvel accélérateur de la destruction de la matière organique dans le dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. (*Ann. Chim. Anal.*, 1922, 266-267.)
105. SCHARRER (K.). — Zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs im Kalkstickstoff. (*Chem. Zeit.*, 1925, 237-238 et 243-244.)
106. SELF (P.-A.). — An unrecognised source of error in the Kjeldahl-Gunning method for the determination of nitrogen. (*Pharm. Journ.*, 1912, **88**, 384-385.)
107. SERIO (F.) et FIANDACA (S.). — Der nach Methode von Kjeldahl nicht bestimmbarer Stickstoff. (*Biochem. Ztschr.*, 1932, **250**, 408-414.)

108. SHEED (O.-M.). — Rapid boiling as an aid to a shortened period of digestion in the determination of nitrogen. (*Chem. Abs.*, 1928, 202, d'après *Journ. Assoc. off. Agr. Chem.*, 1927, **10**, 507-520.)
109. SIMEK (B.-G.). — Dosage de l'azote dans les composés nitrés et diazoïques, d'après Kjeldahl. (*Chimie et Industrie*, 1932, **1**, 298-170b, d'après *Chem. Listy*, 1931, **25**, 322-325.)
110. SISLEY (P.). — Sur une modification du procédé de Kjeldahl. (*Bull. Soc. Chim.*, 1899, **21**, 708.)
111. SISLEY (P.) et DAVID (H.). — Le dosage de l'azote par le procédé Kjeldahl appliqué à l'analyse des matières colorantes et des produits intermédiaires. (*Bull. Soc. Chim.*, 1929, **45**, 312-324.)
112. SIVAN (R.) et RAJU (S.). — Estimation of Nitrogen. A combined Kjeldahl and nesslerization method. (*Chem. Abst.*, 1928, 3859, d'après *Madras Agr. Dept. Yearbook* 1926, 6-10.) [1927.]
113. SJOLLEMA (B.) et SEEKLES (L.). — Über die beschränkte Anwendbarkeit der quantitativen Stickstoffbestimmung mit Nessler's Reagens. (*Biochem. Ztschr.*, 1927, **183**, 240-244.)
114. SNIDER (S.-R.) et COLEMAN (D.-A.). — Some observations on the use of Selenium and its compound as a catalyst in the determination of protein in wheat by the Kjeldahl method. (*Cereal. Chem.*, 1934, **11**, 414-430.)
115. STANKIEWICZ (G.-L. DE). — Contribution à l'étude de la levure de bière dans l'alimentation humaine. (*Thèse doct. en méd.*, Paris, 1933.)
116. STCHERBAK (A.). — Contribution à l'étude de l'influence de l'activité cérébrale sur l'échange d'acide phosphorique et d'azote. (*Arch. Méd. exp.*, 1893, **5**, 309-340.)
117. STEINHOFF (G.). — Nitrogen determination in starch products. (*Chem. Abstr.*, 1933, 6005, d'après *Z. Spiritusind.*, 1933, **56**, 73-74.)
118. TAYLOR (L.-V.). — Use of a Selenium Mercuric-Oxide combination in the determination of Nitrogen in feed materials. (*Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1933, **5**, 263.)

119. TCHEPELEVETZKII et FAIN. — Méthode bromométrique de dosage de l'azote total dans la cyanamide. (*Chimie et Industrie*, 1922, **1**, 1347-875d, d'après *Journ. Prikladn-Khim*, 1931, **4**, 865-871.)
120. TENNANT (J.), HARRELL (H.-L.) et STULL (A.). — Selenium in determination of Nitrogen by Kjeldahl method. (*Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1932, **4**, 410.)
121. TER MEULEN (M.-H.). — Note sur le dosage de l'azote dans les composés organiques par la méthode d'hydrogénation. (*Rec. trav. chim. des Pays-Bas*, 1930, **49**, n° 3, 396-400.)
122. TER MEULEN (M.-H.). — Les méthodes d'hydrogénation dans l'analyse chimique organique. (*Bul. Soc. Chim*, 1931, **49**, 1097-1106.)
123. THORNE (R.-S.-W.). — Determination of the total Nitrogen in yeast. (*Chem. Abst.*, 1932, 3869, d'après *Journ. Inst. Brewing*, 1932, **38**, 23-29.)
124. URBACH (C.). — Quantitative Bestimmung des Gesamtstickstoffs im Harn mittels des Stufenphotometers. (*Biochem. Ztschr.*, 1932, **252**, 292-304.)
125. VILLIERS et MOREAU-TALON. — Sur le dosage de l'azote par le procédé de Kjeldahl. (*Bull. Soc. Chim.*, 1918, **23**, 308-311.)
126. VLADescu (I.) et ZAPOROJANU (I.). — Methods for estimating total Nitrogen and their application to tobacco. (*Chem. Abst.*, 1934, 4004, d'après *Bul. Cultivarei fermentarei tutunulei*, 1933, **22**, 376-390.)
127. WAHL (A.) et SISLEY (J.-P.). — Modifications apportées à la méthode d'analyse organique élémentaire. (*Bull. Soc. Chim.*, 1925, **43**, 1279-1287.)
128. WEIZMANN (M.), YOFE (J.) et KIRZON (B.). — Eine Nitrostickstoffbestimmungsmethode nach Kjeldahl in aromatischen Verbindungen. (*Ztschr. für physiol. Chem.*, 1930, **192**, 70-72.)
129. WEST (E.-S.) et BRANDON (A.-L.). — Improved direct nesslerization micro-Kjeldahl method for Nitrogen. (*Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1932, **4**, 314-315.)

130. WHITAKER (J.-W.). — Méthode rapide pour doser l'azote dans le charbon. (*Ann. Chim. Anal.*, 1929, **34**, 203, d'après *Fuel*, 1928, **8**, 145.)
 131. WIRBEL. — Dosage de l'azote total dans les urines. (*Union Pharmaceutique*, 1931, **72**, 1.)
 132. WIENINGER (F.-M.). — A new rapid method of Nitrogen determination. (*Chem. Abst.*, 1933, 5885, d'après *Wochenschr. Brauerei*, 1933, **50**, n° 16, 124.)
 133. WILFARTH. — Eine Modification des Kjeldahl'schen Stickstoffbestimmung methode. (*Chem. Centralbl.*, 1885 (3° F), **16**, 17 et 113.)
 134. YOE (J.-H.). — Emploi de l'acide perchlorique comme réactif analytique. (*Ann. Chim. Anal.*, 1925, **7**, 193-197.)
-

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
<i>Introduction</i>	11
PREMIÈRE PARTIE. — ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES MODIFI- CATIONS APPORTÉES A LA MÉTHODE DE KJELDAHL DEPUIS 1924	17
<i>Remarques préliminaires</i>	19
Chapitre I. — <i>Elévateurs de température</i>	21
Chapitre II. — <i>Réducteurs</i>	25
Chapitre III. — <i>Catalyseurs</i>	29
Chapitre IV. — <i>Réducto-catalyseurs</i>	33

	PAGES
Chapitre V. — <i>Oxydo-catalyseurs</i>	37
Chapitre VI. — <i>Oxydants</i>	41
DEUXIÈME PARTIE. — CONDITIONS D'EMPLOI DE L'ACIDE PER- CHLORIQUE POUR LA DESTRUCTION DES MATIÈRES ORGANIQUES, EN VUE DU DOSAGE DE L'AZOTE	51
<i>Introduction</i>	53
<i>Remarques préliminaires</i>	55
Chapitre I. — <i>Action de l'acide perchlorique sur les sels ammoniacaux</i>	57
Chapitre II. — <i>Influence de la quantité d'acide perchlori- que employée</i>	59
Chapitre III. — <i>Influence de la concentration de l'acide employé</i>	61
Chapitre IV. — <i>Influence du moment d'introduction de l'acide perchlorique</i>	63
Chapitre V. — <i>Influence de la durée de l'ébullition après décoloration du liquide de destruction</i> ..	67
<i>Conclusions</i>	71
TROISIÈME PARTIE	73
Chapitre I. — <i>Application du mode de destruction sulfo- perchlorique au dosage de l'azote dans des corps chimiquement définis</i>	75
A. <i>Remarques générales</i>	75
B. <i>Résultats obtenus</i>	78
C. <i>Conclusions</i>	85

Chapitre II. — <i>Application du mode de destruction sulfo-perchlorique au dosage de l'azote dans les substances biologiques</i>	87
A. Urine	87
B. Matières alimentaires	92
C. Lait	94
Chapitre III. — <i>Application du mode de destruction sulfo-perchlorique à la recherche qualitative de l'azote</i>	95
<i>Conclusions</i>	101
<i>Bibliographie</i>	105

TABLE DES GRAVURES

	PAGES
Fig. 1.	56
Fig. 2.	76

Imp. HENRY, 30, rue Pascal, Paris (5^e).
